

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
СЕКЦИЯ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Л. А. ОСТЕРМАН

ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Ответственный редактор
член-корреспондент АН СССР
Г. П. ГЕОРГИЕВ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

МОСКВА 1985

УДК 543.545.4 : 547.96

О с т е р м а н Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.

В книге дан подробный анализ современных технических приемов хроматографии и возможностей новейшей аппаратуры, а также полный справочный материал по обменникам и сорбентам. Анализируются последние достижения в гель-фильтрации, распределительной, адсорбционной, ионообменной, аффинной и тонкослойной хроматографии. В каждом из методов наряду с обычной хроматографией рассмотрены достижения методов высокоэффективной хроматографии при высоком давлении в колонках и на микропластинках.

Рассчитана на биохимиков, химиков, медиков, фармакологов, работников пищевой и микробиологической промышленности, а также на студентов и преподавателей.

Лев Абрамович Остерман

ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Утверждено к печати

Секцией химико-технологических и биологических наук

Редактор П. П. Горожанин. Художественный редактор М. В. Версоцкая
Технический редактор Н. Н. Плехова. Корректоры А. Б. Васильев, Г. Н. Джиоева,
Н. И. Казарина

ИБ № 29034

Сдано в набор 12.10.84. Подписано к печати 21.01.85. Т-01024. Формат 60×90^{1/16}
Бумага типографская № 1. Гарнитура обыкновенная. Печать высокая. Усл. печ. л. 33,5.
Усл. кр. отт. 33,5. У.-изд. л. 39,5. Тираж 8500 экз. Тип. зак. 721. Цена 2 р. 80 к.

Ордена Трудового Красного Знамени

издательство «Наука» 117864 ГСП-7, Москва В-485, Профсоюзная ул., 90.

2-я типография издательства «Наука» 121093, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6

ВВЕДЕНИЕ

Среди лабораторных методов очистки, фракционирования и анализа структуры белков, нуклеиновых кислот и их компонентов совокупность различных хроматографических методов занимает центральное место. Ни один другой метод не может сравниться с хроматографией по широте количественного диапазона. Начиная от препаративных колонок объемом в несколько литров, на которых можно вести фракционирование граммовых количеств препарата на первых этапах выделения фермента, через разделение близких по своей природе компонентов очищенной смеси веществ, количество которых измеряется миллиграммами или долями миллиграмма, этот диапазон простирается до микроанализа аминокислотного состава белка, когда на колонку вносят сотые доли микрограмма исходного гидролизата. Вне конкуренции остается и разнообразие физико-химических параметров, по которым может осуществляться хроматографическое фракционирование: молекулярные размеры, вторичная или третичная структура биополимеров, растворимость, адсорбционные характеристики молекул, степень их гидрофобности, электрический заряд и, наконец, биологическое сродство к другим молекулам.

Естественно, что фракционирование по столь широкому кругу параметров реализуется путем использования достаточно разнообразных методических подходов и аппаратуры. Тем не менее, одна принципиальная особенность остается неизменной для всех этих подходов, что и позволяет объединить их в одну категорию хроматографических методов. В любом из них можно обнаружить двухфазную систему, в которой одна фаза неподвижна, а другая перемещается относительно нее с некоторой скоростью в одном определенном направлении. Неподвижная фаза остается неизменной, заполняя полость трубки (хроматографической «колонок») или фиксируясь на поверхности стеклянной или пластиковой пластинки; иногда ее основу образует фильтровальная бумага или пленка ацетицеллюлозы. Подвижная фаза непрерывно обновляется, поступая в систему с одного ее конца и покидая с другого. Молекулы компонентов исходной смеси веществ распределяются между двумя фазами в соответствии со степенями своего сродства к ним. На каждом участке неподвижной фазы это распределение стремится к состоянию динамического равновесия, которое непрерывно нарушается вследствие перемещения подвижной фазы. В результате постоянно идущего перераспределения молекул вещества между фазами они мигрируют в направлении течения подвижной фазы. Скорость такой миграции тем меньше, чем больше сродство молекул к неподвижной фазе. Распределение между фазами происходит независимо для каждого компонента смеси веществ. Если соотношения сродства к двум фазам у молекул разных компонентов смеси не одина-

ковы, то они мигрируют в направлении течения подвижной фазы, т. е. вдоль пути хроматографического разделения (например, вдоль колонки), с различными скоростями, что и позволяет физически отделить эти компоненты друг от друга в конце такого пути.

Соотношение средства к подвижной и неподвижной фазам может определяться доминирующей ролью тех или иных физико-химических характеристик как фракционируемых молекул, так и обеих фаз, а также их биологической специфичностью. В соответствии с этими характеристиками и природой отвечающего им средства проводится классификация хроматографических методов, с которой начинается первая глава. Рассмотрению их практического использования в той же главе предпослан краткий теоретический анализ принципиальных особенностей любого хроматографического процесса. Этот анализ не претендует на строгость и носит качественный характер.

Неподвижная фаза может быть твердой или жидкой, подвижная — жидкой или газообразной. В зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы различают «жидкостную» и «газовую» хроматографию. Для очистки и фракционирования белков, нулеиновых кислот и их компонентов используется почти исключительно жидкостная хроматография, поэтому (в соответствии с названием книги) мы ограничимся рассмотрением только этого вида хроматографии во всех его вариантах, каждому из которых посвящена отдельная глава. Варианты жидкостной хроматографии различаются по природе средства фракционируемых молекул к хроматографическим фазам; в соответствии с этим при изложении мы опираемся на классификацию по принципу фракционирования. Бурно развивающиеся в последние годы методы хроматографии при высоком давлении включены в состав каждой главы в виде особых разделов. Тонкослойную хроматографию, ввиду ее технического своеобразия, имеет смысл выделить в отдельную главу, хотя в рамках этой главы и приходится рассматривать различные варианты взаимодействия веществ с хроматографическими фазами.

Характеристики и номенклатура различных специализированных продажных сорбентов (обменников, смол, пластинок и др.) включены в соответствующие главы, однако достаточно подробное рассмотрение свойств материалов матриц, на базе которых такие сорбенты изготавливаются, целесообразно выделить в отдельную главу, поскольку эти свойства необходимо иметь в виду при использовании любого продажного сорбента.

Описанию современной хроматографической техники (колонок, насосов, детекторов, коллекторов фракций и др.) также посвящена отдельная глава. Наряду с рассмотрением принципов работы этих устройств сюда включены и сопоставляются данные каталогов по последним (на конец 1983 г.) моделям соответствующей аппаратуры, особенно многочисленным для высокоэффективной хроматографии при высоком давлении. В этой же главе приведены подробные рекомендации по общим для всех вариантов хроматографии методическим приемам: подготовке колонок, внесению препаратов, осуществлению элюции, детектированию фракций и др.

Включенные в текст многочисленные примеры из новейшей периодической литературы предназначены только для иллюстрации определенных положений и потому цитируются лишь в той мере, которая необходима для этой цели.

В ноябре 1983 г. состоялся 3-й Международный симпозиум по ЖХВД белков, пептидов и полинуклеотидов; его материалы опубликованы [1] (эту ссылку и все дальнейшие — см. ниже). При фракционировании белков основное внимание уделялось ускорению процесса, а не использованию возможностей ЖХВД для повышения разрешающей способности метода при умеренных скоростях элюции, хотя такая возможность была недавно подтверждена экспериментально Като и соавторами [2]. Обращает на себя внимание развитие метода фракционирования белков в снижающемся градиенте концентрации соли за счет гидрофобного взаимодействия с сорбентом [3—6]. Для гель-фильтрации белков при средних давлениях использовались мелкозернистые (3—10 мкм) концентрированные (до 20%) гели агарозы, которые выгодно отличаются от крупнопористых силикагелей меньшим уровнем сорбции и лучшим разрешением пиков [7, 8]. Джон и Шмидт показали возможность тонкого фракционирования белков на длинной (1,25 м) колонке нового мелкозернистого оксиапатита фирмы «Bio-Rad» [9]. На этом же сорбенте удалось очистить иммуноглобулины прямо из культуральной жидкости лимфобластов и гибридом [10]. Описано быстрое разделение однонитевой и двунитевой ДНК обратнотазовой ЖХВД на октадецилсиликагеле [11]. Наконец, бесспорный интерес представляет предложение использовать для очистки мРНК поли(U)-бумагу взамен олиго(dT)-целлюлозы — это намного быстрее, а мРНК выходит в малом объеме [12]. Все большую популярность приобретают сорбенты японской фирмы «Toyo-Soda». Подробные сведения о них и о некоторых других новых сорбентах приведены в прил. 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. 3rd Int. Symp, on HPLC of proteins, peptides and polynucleotides.— J. Chromat., 1984, 296, 297.
2. Kato Y., Sasaki M., Hashimoto T. et al.— J. Chromat., 1983, 266, p. 341—349.
3. Gooding D. L., Schmuck M. N., Gooding K. M.— J. Chromat., 1984, 296, p. 107—114.
4. Sakihama N., Ohmori H., Sugimoto N. et al.— J. Biochem., 1983, 93, p. 129—134.
5. Shin M. et al.— Anal. Biochem., 1984, 138, p. 259—261.
6. Fansnaugh J. L. et al.— Anal. Biochem., 1984, 137, p. 464—472.
7. Hjertén S., Eriksson H.-O.— Anal. Biochem., 1984, 137, p. 313—317.
8. Hjertén S., Lin Z.-Q., Yang D.— J. Chromat., 1984, 296, p. 115—120.
9. John M., Schmidt J.— Anal. Biochem., 1984, 141, p. 466—471.
10. Smith G. J. et al.— Anal. Biochem., 1984, 141, p. 432—436.
11. Liautard J. P.— J. Chromat., 1984, 285, p. 221—225.
12. Werner D., Chemla Y., Herzberg M. Anal. Biochem., 1984, 141, p. 329—336.

КЛАССИФИКАЦИЯ И ЭЛЕМЕНТЫ ТЕОРИИ ХРОМАТОГРАФИИ

КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Всем хроматографическим методам присущи некоторые общие характеристики, позволяющие ниже изложить элементы их обобщенной теории. Однако сначала рассмотрим специфические особенности различных вариантов хроматографического фракционирования. Это, с одной стороны, позволит за теоретическими рассуждениями все время видеть реальные черты хроматографического эксперимента, а с другой — даст возможность ввести классификацию хроматографических методов. В ходе дальнейшего изложения (в частности, для его разбиения по главам) удобнее всего классифицировать методы по основному принципу фракционирования. Такую классификацию мы рассмотрим достаточно подробно и лишь в конце раздела кратко отметим другие возможные варианты классификации.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПО ПРИНЦИПУ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

Как уже упоминалось, в любом хроматографическом процессе фигурируют неподвижная и подвижная фазы, между которыми распределяются молекулы фракционируемой смеси веществ. Под основным принципом фракционирования будем подразумевать природу физического, химического или биологического явления, обуславливающего такое распределение.

Гель-фильтрация

В этом простейшем варианте хроматографии молекулы фракционируемых веществ не должны обладать никаким специальным сродством к неподвижной или подвижной фазам. Неподвижная фаза здесь представлена жидкостью, находящейся внутри пористых гранул, — точно такой же, как и жидкость подвижной фазы, протекающей между ними. Благодаря силам сцепления с поверхностью пространственной сетки полимера или иного пористого материала, образующего гранулы, жидкость внутри них остается неподвижной и не увлекается течением подвижной фазы. В подавляющем большинстве случаев применения гель-фильтрации для биологических целей рабочей жидкостью служат водно-солевые растворы, а материалы гранул гидрофильны.

Переход молекул вещества из подвижной фазы в неподвижную и обратно за счет диффузии ничем не затруднен. Иная ситуация складывается внутри гранул. Здесь диффузия более или менее затруднена из-за столкновений молекул диффундирующего вещества с нитями пространственной сетки полимера или стенками пор. Если размеры молекул соизмеримы со средним диаметром каналов в гранулах, то эти затруднения становятся весьма существенными и диффузия тормозится. Может сложиться и такое положение, когда часть внутреннего объема гранул, т. е. часть объема неподвижной фазы (а иногда и весь этот объем), оказывается недоступной для молекул вещества, растворенного в подвижной фазе.

Различие степени доступности объема неподвижной фазы для молекул различных компонентов исходной смеси веществ является фактором, определяющим возможность их фракционирования. Очевидно, что оно будет происходить по размерам молекул. Если в составе смеси имеются очень крупные молекулы, вовсе не проникающие внутрь гранул, то они будут выходить из колонки или достигать края хроматографической пластины вместе с передним фронтом подвижной фазы («фронтом элюции»). В то же время мелкие молекулы, свободно диффундирующие внутрь гранул, часть времени будут находиться в неподвижной фазе. Статистически эта часть времени одинакова для всех молекул такого размера и зависит от соотношения объемов жидкости в неподвижной и подвижной фазах. Таким образом, все мелкие молекулы достигнут конца хроматографического пути более или менее одновременно и заведомо позднее, чем крупные. Молекулы промежуточных размеров, для которых из-за разброса значений эффективных диаметров пор внутри гранул неподвижной фазы доступна только часть ее объема, должны, очевидно, перемещаться вдоль колонки или пластины с промежуточной скоростью.

Это явление первоначально было названо «гель-фильтрацией», поскольку в качестве пространственной сетки использовали полимерные гели. Однако эти гели относительно легко деформируются и для хроматографии при высоком давлении непригодны, поэтому их стали заменять жесткими материалами, в частности пористым стеклом и силикагелем. Иногда для этого варианта хроматографии вводят термин «эксклюзивная хроматография» («exclusion» — исключение; имеется в виду исключение из гранул крупных молекул). Поскольку сейчас силикагель явно вытесняет пористое стекло, мы сохраним для рассматриваемого варианта хроматографии прежнее название — гель-фильтрация.

Очевидно, что размеры молекул связаны с их массами, но отнюдь не целиком ими определяются. Это особенно важно учитывать в случае макромолекул, размеры которых могут существенно зависеть от плотности упаковки полипептидной или полинуклеотидной цепи. В ограничении свободы диффузии через пространственную сетку пор внутри гранул немалую роль может играть и форма молекулы. Очевидно, что сферическая глобула будет диффундировать иначе, чем молекула такого же объема, но вытянутая в виде палочки.

Пористые материалы для гель-фильтрации чаще всего выпускаются в виде сферических гранул целого набора диаметров с различными средними размерами пор. Выбор этих размеров обоснован в гл. 4, посвященной методу гель-фильтрации.

Распределительная хроматография

Строго говоря, так следует назвать хроматографический процесс, в котором неподвижная и подвижная фазы представлены двумя несмешивающимися или частично смешивающимися жидкостями. Если в системе двух контактирующих между собой жидкостей такого рода растворять какое-либо вещество, то его концентрация в этих растворителях будет одинакова только в том случае, если оба они обладают одинаковой растворяющей способностью, т. е. одинаковым средством к веществу. В противном случае молекулы вещества будут переходить из одной жидкости в другую до тех пор, пока не установится равновесие, которому будет отвечать более высокая концентрация этих молекул в той жидкости, растворяющая способность которой выше. Если такие жидкости представляют собой неподвижную и подвижную хроматографические фазы, то распределение вещества между фазами происходит в соответствии с растворимостями в них компонентов исходной смеси, причем для каждого компонента — независимо от всех других (если, разумеется, свойства самих растворителей при этом не изменяются). Чем выше средство данного компонента к неподвижной фазе, тем медленнее он мигрирует вдоль колонки или пластинки.

Жидкость неподвижной фазы, как и при гель-фильтрации, может быть просто иммобилизована внутри пористых гранул, или, например, быть прочно связана с волокнами набухшей целлюлозы, или же покрывать тонкой пленкой гранулы из сплошного материала и поверхность пор внутри них. Покрытие может осуществляться за счет смачивания, сорбции или химическим путем. В последнем случае нередко «пленка» жидкости сводится к мономолекулярному слою вещества, способного удерживать близ своей поверхности молекулы компонентов фракционируемой смеси в соответствии со степенью их средства к нему. В этом случае о соотношении растворимостей говорить трудно, так что лучше оперировать только понятиями «средства» того или иного компонента к неподвижной и подвижной фазам, что, впрочем, с позиций теории хроматографии сведется к точно такой же, как при истинном растворении, количественной характеристике равновесного распределения фракционируемого материала между двумя фазами. Если в процессе распределительной хроматографии участвуют две истинные жидкости, то для осуществления равновесного распределения вещества они сами тоже должны быть в равновесии между собой, т. е. в случае частичной их растворимости друг в друге должны быть взаимно насыщенными.

Очень часто одна из фаз обогащена органическим растворителем, в то время как другая является в основном водной. Естественно, что в этом случае фракционирование веществ идет по степени их

гидрофобности. Исторически сложилось так, что «нормальным» расположением фаз называют такое, при котором неподвижной является водная фаза. За счет смачивания (набухания) она легко фиксируется на гидрофильных матрицах (целлюлозе, полиакриламидном или декстрановом гелях, диатомовых землях, силикагеле и др.). В состав подвижной фазы в этом случае входят органические растворители. При обратном расположении фаз, когда на твердой матрице фиксируют пленку органического растворителя, а подвижная фаза представляет собой водный раствор, распределительную хроматографию называют хроматографией в обращенных фазах (ХОФ). В английской литературе ее обозначают RPC (reversed phase chromatography). ХОФ при высоком давлении нередко осуществляют таким образом, что неподвижная фаза вместо пленки органического растворителя представлена монослоем молекул жирного или ароматического ряда, химически закрепленных на поверхности твердой матрицы силикагеля. В качестве матриц для ХОФ с истинно жидкой неподвижной фазой часто используют предварительно силиконированные диатомовые земли типа кизельгуров.

Адсорбционная хроматография

В этом процессе неподвижная фаза представляет собой твердый сорбент. Равновесие процессов сорбции и десорбции в условиях, достаточно далеких от насыщения емкости сорбента, устанавливается независимо для каждого компонента смеси веществ. Различие в коэффициентах адсорбции обуславливает разницу в распределении этих компонентов между сорбентом и подвижной жидкой фазой. Соответственно чем большим сродством к сорбенту обладает данный компонент смеси, тем медленнее он будет мигрировать вслед за элюентом вдоль колонки или пластинки. Если сорбция происходит на наружной поверхности сплошных гранул, то имеет место адсорбционная хроматография в чистом виде. Если же материал сорбента имеет пористую структуру и большая часть сорбирующей поверхности находится внутри его гранул, то в задержании молекул вещества в неподвижной фазе участвует еще и процесс их диффузии в неподвижной жидкости внутри пор, подобно тому как это имеет место при гель-фильтрации. Практически, впрочем, связывание вещества за счет сорбции доминирует.

Ионообменная хроматография

Этот процесс сходен с предыдущим в том смысле, что задержание молекул вещества в неподвижной фазе обусловлено их связыванием с поверхностью твердого гидрофильного материала сплошных или пористых гранул, находящихся в контакте с жидким элюентом. Однако в этом варианте хроматографии задержание происходит не за счет молекулярной адсорбции, а в результате электростатического взаимодействия разноименно заряженных ионов.

На всех наружных и внутренних поверхностях твердых гранул

вдоль нитей полимеров и гелей, образующих пространственную сетку, более или менее равномерно распределены ковалентно связанные с этими поверхностями ионогенные группы. В омывающем их водном элюенте они диссоциируют, образуя сетку одноименно заряженных неподвижных ионов. Если молекулы компонентов фракционируемой смеси тоже способны ионизироваться при растворении, причем так, что их суммарный заряд¹ имеет противоположный знак, то они связываются с неподвижными ионогенными группами силами электростатического взаимодействия, оказываясь тем самым фиксированными в неподвижной фазе. Связь эта обратима: ионы одних компонентов могут замещаться на другие или вытесняться находящимися в элюенте контрионами ионогенных групп сорбента, а также специально вводимыми для этой цели в элюент ионами. Происходит обмен ионов, поэтому сорбенты описанного типа называют ионообменниками.

Возможность фракционирования компонентов смеси веществ обусловлена здесь различием в значениях их суммарных зарядов. Последние зависят как от числа и характера ионогенных групп в молекулах, так и от полноты их диссоциации, которую можно контролировать путем выбора pH и ионной силы элюента. Чем больше в данных условиях элюции суммарный заряд того или иного компонента смеси, тем сильнее его взаимодействие с ионообменником и тем медленнее он мигрирует вдоль колонки. На очерченный здесь основной процесс ионообменной хроматографии влияет ряд дополнительных факторов. Среди них, кроме уже фигурировавшей ранее затрудненной (особенно для крупных молекул) диффузии внутри гранул, следует назвать возможность неионной адсорбции на поверхности матрицы ионообменника. Однако при правильном выборе материала обменника, и в частности его пористости, основную роль в процессе фракционирования играет явление ионного обмена.

Аффинная хроматография

Относительно слабое обратимое взаимодействие между молекулами биополимеров и сорбентом может осуществляться за счет сил биологического сродства. Такие силы действуют, например, между ферментом и его субстратом или ингибитором, антигеном и антителом, гормоном и рецептором и т. д. Для осуществления фракционирования по биологическому сродству, т. е. методом аффинной хроматографии, один из «партнеров» такой пары химически закрепляют на матрице «биоаффинного» сорбента, а сорбцией и элюцией второго «партнера» управляют путем изменения условий биологического взаимодействия в результате введения в элюент солей, мочевины, детергентов, конкурирующих молекул или изменения его pH. В большинстве случаев имеет место не хроматографический процесс фракционирования смеси веществ, а очистка одного из них путем

¹ Большинство биологических молекул имеет амфотерный характер. Их суммарный заряд зависит от pH раствора.

избирательной сорбции, промывки и последующей десорбции. Впрочем, возможны варианты и истинной хроматографии, использующей явление аффинного взаимодействия. При этом фракционированию подвергается смесь близко родственных биологических макромолекул, различающихся по своему средству к одному и тому же аффинному сорбенту.

Иногда явление биологического средства используется только в процессе элюции. В этом случае вещество связывается с поверхностью твердого сорбента за счет ионного взаимодействия или сил адсорбции, а элюцию осуществляют путем увеличения его средства к элюенту, куда вводят биологически родственные (в указанном выше смысле) молекулы. Такой процесс было бы точнее называть аффинной элюцией. Имеются примеры, когда один из партнеров аффинной пары имеет не биологическое происхождение, а представляет собой, например, сложный краситель, пространственная конфигурация которого имитирует какую-либо биологическую структуру.

Аффинная хроматография отличается чрезвычайно высокой избирательностью, присущей биологическим взаимодействиям. Нередко одна хроматографическая процедура позволяет очистить нужный белок в тысячи раз. Это оправдывает затраты усилий на приготовление аффинного сорбента, что не всегда оказывается легкой задачей ввиду опасности утраты биологическими молекулами способности к специфическому взаимодействию в ходе их ковалентного присоединения к матрице.

Очистку белков и нуклеиновых кислот на аффинных сорбентах часто ведут не на колонках, а в объеме — методами центрифугирования и декантации. Эти методы рассмотрены ниже наряду с аффинной хроматографией на колонках.

Остановимся теперь вкратце на других способах классификации хроматографических методов.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПО СПОСОБУ ЭЛЮЦИИ

Фронтальный анализ

Так называется вариант хроматографического процесса, когда раствор смеси компонентов непрерывно подается на вход хроматографической колонки. На выходе ее в этом случае появляются один за другим несколько «фронтов» элюата. За первым из них следует чистый, быстрее других мигрирующий в данной системе компонент смеси, отличающийся, очевидно, наименьшим средством к неподвижной фазе. Второй фронт отмечает добавление к нему следующего по подвижности компонента. За третьим фронтом следует уже смесь трех компонентов. В настоящее время по вполне понятным причинам фронтальный анализ почти вышел из употребления и применяется лишь в отдельных, специальных случаях. На нем мы более подробно останавливаться не будем.

Вытеснительная хроматография

В этом варианте в колонку или на стартовую линию хроматографической пластинки наносят определенную порцию раствора исходной смеси веществ, а затем ведут элюцию раствором вещества, обладающего заведомо большим сродством к неподвижной фазе хроматографической системы, чем любой из компонентов смеси. Происходит вытеснение их из неподвижной фазы, причем в первую очередь тех, которые обладают меньшим сродством к сорбенту, а затем и всех остальных. Элюент выталкивает все компоненты смеси впереди себя наподобие поршня. Так как они выходят в подвижную фазу концентрированными, то между ними также идет конкуренция за связь с неподвижной фазой. Компоненты, уступающие другим в силе сродства к этой фазе, оттесняются еще вперед, где сорбируются, но только до тех пор, пока их опять не вытеснят компоненты, обладающие большим сродством к сорбенту. В результате такого чередования сорбции и вытеснения компоненты смеси будут выходить из колонки один за другим в порядке возрастания силы их связи с неподвижной фазой. Ясно, что при этом зоны соседних компонентов будут соприкасаться или даже немного перекрываться друг с другом. Для аналитического фракционирования метод непригоден, но хорош для препаративного или полупромышленного разделения веществ, поскольку емкость колонки здесь используется очень эффективно.

Хроматографическая элюция

В отличие от предыдущего в этом методе элюирующий раствор обладает меньшим сродством к сорбенту, чем любой из компонентов вносимой на колонку или пластинку смеси веществ. Эти компоненты постепенно «вымываются» из неподвижной фазы и движутся вдоль колонки за счет непрерывного перераспределения их молекул между неподвижной фазой и элюентом. Каждый из них мигрирует независимо от других в соответствии с соотношением сил его сродства к неподвижной и подвижной фазам. Миграция идет тем медленнее, чем больше сродство к неподвижной фазе. Именно этот, пригодный для аналитических целей вариант хроматографии подробно рассмотрен в следующем разделе, поэтому здесь можно ограничиться указанием на то, что при хроматографической элюции компоненты смеси выходят из колонки отдельными, разделенными друг от друга зонами, которые в соответствии с типичной формой профиля распределения вещества в каждой такой зоне (см. ниже) часто называют хроматографическими пиками.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПО РАСПОЛОЖЕНИЮ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

Эта классификация не требует особых пояснений. Если пористые гранулы геля или сорбента для любого типа хроматографии заполняют стеклянную или металлическую колонку, то говорят о хрома-

тографии на колонке, или «колоночной хроматографии», хотя последнее выражение относится к категории укоренившегося жаргона. Хроматографию на колонке во многих случаях теперь ведут при очень большом давлении подачи элюента (до 300—400 атм), что позволяет уменьшить диаметр гранул до 5—10 мкм с вытекающими отсюда (см. ниже) существенными преимуществами в скорости и качестве фракционирования микроколичеств исходного вещества. За это приходится расплачиваться использованием дорогостоящих стальных прецизионных колонок и специальной аппаратуры, но в случае серийных анализов такие затраты себя оправдывают. Жидкостную хроматографию на колонках при высоком давлении условимся сокращенно обозначать ЖХВД. В английской литературе принято обозначение HPLC, которое расшифровывают как «high pressure (иногда — high performance) liquid chromatography».

Если хроматографический процесс идет в наклонно расположенном, ровном и относительно толстом (несколько миллиметров), открытом с поверхности слое гранул, между которыми жидкость подвижной фазы течет только под действием силы тяжести, то его можно назвать *хроматографией в толстом слое*. Практически этот метод нашел себе применение только для гель-фильтрации.

Тонкий (0,1—0,5 мм) слой гранул, адсорбированных или иным образом закрепленных на поверхности пластинки из стекла или пластика, позволяет осуществлять *хроматографию в тонком слое*, или *«тонкослойную хроматографию»* (ТСХ). Английское обозначение TLC (thin layer chromatography). Движение жидкой фазы происходит за счет капиллярных сил.

Вместо тонкого слоя сорбента на основе целлюлозы можно использовать просто фильтровальную бумагу, иногда специальную — с введенными в нее ионогенными группами. Соответствующий процесс следует называть *хроматографией на бумаге*.

Вместо бумаги для аналогичного типа хроматографии используют пленки из модифицированной целлюлозы, полиамидные пленки и т. д. — это варианты *хроматографии на пленках*.

Пластинки, бумага или пленка могут располагаться горизонтально или вертикально; в последнем случае движение подвижной фазы может быть восходящим или нисходящим — это не играет принципиальной роли, так как оно обусловлено в основном капиллярными силами. Препараты на пластинки или бумагу чаще всего наносят в виде полосы или пятна раствора у одного края сорбента, неподалеку от уровня элюирующей жидкости, в которую этот край погружают. В последнее время для ТСХ все чаще применяют вариант *кольцевой хроматографии*, когда исходный препарат наносят в виде кольца, а элюция идет радиально.

ЭЛЕМЕНТЫ ТЕОРИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ЭЛЮЦИИ

Несмотря на различия физических процессов, лежащих в основе методов хроматографического фракционирования, можно провести теоретическое рассмотрение ряда основных вопросов, общих для всех этих методов. Разумеется, здесь нет места для глубокого изложения теории хроматографии, но ознакомиться с ее основными положениями и выводами имеет смысл как для понимания ссылок и терминов, встречающихся в литературе, так и потому, что некоторые из этих выводов носят сугубо практический характер. Кроме того, знание общих закономерностей процесса хроматографической элюции послужит основой для дальнейшего, более углубленного анализа каждого из описываемых ниже специфических методов хроматографии.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС

Для того чтобы рассмотрение было действительно общим, оно должно опираться на самое общее определение процесса хроматографической элюции, или хроматографического процесса. Хотя существенные особенности этого процесса уже были рассмотрены во введении, имеет смысл повторить их еще раз в виде краткой формулировки, исходной для всего дальнейшего анализа. Под хроматографическим процессом будем подразумевать процесс движения хроматографируемого вещества в системе двух фаз, одна из которых неподвижна, а вторая перемещается относительно первой. Это перемещение увлекает вещество и обуславливает его миграцию, в ходе которой оно непрерывно перераспределяется между двумя фазами. Скорость миграции зависит от соотношения степеней сродства вещества к неподвижной и подвижной фазам. Если эти соотношения для компонентов исходной смеси не одинаковы, то они мигрируют с разными скоростями и их удается физически отделить друг от друга, после того как они пройдут достаточно длинный для такого разделения путь.

Поскольку распределение молекул вещества между неподвижной и подвижной фазами носит статистический характер, то очевидно, что в каждое данное мгновение подвижная фаза увлекает за собой лишь часть этих молекул. При этом все они со статистической неизбежностью «обречены» рано или поздно перейти в неподвижную фазу и временно задержаться в ней. На их место в подвижную фазу будут выходить молекулы, уже «потерявшие время» в неподвижной фазе. Отсюда следует качественный вывод о том, что в хроматографическом процессе скорость миграции вещества должна быть в принципе меньше, чем скорость перемещения подвижной фазы, и, по-видимому, тем меньше, чем больше сродство этого вещества к неподвижной фазе. При этом мы не накладываем других ограничений на природу самого сродства, кроме одного: взаимодействие

должно быть обратимым. Это может быть и предпочтительная растворимость, и обратимая сорбция, и электростатическое, гидрофобное или специфически биологическое взаимодействие, и даже просто пребывание молекул в иммобилизованном объеме того же самого растворителя, что и в подвижной фазе, как это имеет место при гель-фильтрации.

Направленное перемещение подвижной фазы, а вслед за ней и хроматографируемого вещества должно, очевидно, происходить в какой-то направляющей системе, например в трубке, полоске фильтровальной бумаги, тонком слое на пластинке и др. Для удобства изложения в этой главе речь идет в основном о трубках, которые называют хроматографическими колонками. Приложимость полученных выводов к другим хроматографическим системам будет рассмотрена ниже.

Практически хроматографическому фракционированию подвергается отнюдь не бесконечно малое количество вещества, и оно соответственно должно занимать изначально некоторый объем на старте своего движения. Далее будет показано, что в ходе хроматографической миграции каждое индивидуальное вещество перемещается в направляющей системе в ограниченном (постепенно изменяющемся) объеме. Эти объемы и соответствующие им участки длины колонки, равно как пятна и полосы на хроматографической пластинке, будем ниже именовать хроматографическими зонами, или просто зонами. С рассмотрения ситуации внутри такой зоны и целесообразно начать анализ хроматографического процесса.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ЗОНА

Простейшим вариантом двухфазной хроматографической системы может служить капилляр, по которому медленно протекает раствор вещества, обратимо сорбирующегося на его стенках. Такой вариант неудобен: капилляр должен быть очень тонким, для того чтобы диффузия молекул из тока жидкости к стенкам и обратно шла достаточно быстро. Количество вещества, которое можно фракционировать в такой хроматографической системе, будет ничтожно малым. Разумеется, можно использовать пачку капилляров, но удобнее заполнить достаточно широкую трубку очень мелкими стеклянными шариками примерно одинакового диаметра. Совокупная поверхность шариков будет служить неподвижной фазой («сорбентом»), а жидкость, текущая между ними, — подвижной. Для улучшения сорбции поверхность шариков можно специально химически обработать или покрыть тонким слоем специфически сорбирующего вещества (см. ниже).

Если неподвижная фаза должна быть также жидкой, то трубку (колонку) следует заполнить шариками из пористого стекла или другого пористого материала. Жидкость, находящаяся внутри таких «гранул», не увлекается током подвижной фазы. Молекулы вещества свободно переходят из подвижной фазы внутрь гранул

(где их поступательное движение прекращается) и обратно. Если поры достаточно велики по сравнению с линейными размерами молекул, то последние практически свободно диффундируют по всему внутреннему объему гранул. Если размеры пор и молекул сравнимы, то диффузия внутрь гранул может быть затруднена (гель-фильтрация). В любом случае жидкость внутри гранул играет роль неподвижной фазы.

Возможны, как нам известно, и более сложные варианты неподвижной фазы. Например, проникшие внутрь гранул молекулы могут сорбироваться нитями полимера, образующего пространственную сетку пор (адсорбционная хроматография), или взаимодействовать с закрепленными на этих нитях ионными группами (ионообменная хроматография). При этом сродство вещества к неподвижной фазе внутри гранул может оказаться во много раз больше, чем в случае, когда такое «сродство» обусловлено только статистическим распределением свободно диффундирующих молекул в жидкости вне и внутри гранул.

Подробно различные варианты связывания молекул фракционируемых веществ внутри неподвижной фазы рассмотрены ниже, при описании соответствующих методов хроматографии. Сейчас достаточно отметить три общих для всех вариантов обстоятельства. Во-первых, неподвижная фаза занимает определенный объем и определенную часть площади любого сечения колонки (рис. 1). Во-вторых, диффузия молекул от подвижной фазы к неподвижной и обратно протекает свободно и (благодаря малым размерам гранул) на относительно небольших расстояниях. В-третьих, для каждого вещества имеет место определенное соотношение между степенями его сродства к подвижной и неподвижной фазам системы.

Так как физическая природа сил взаимодействия вещества с неподвижной фазой нас пока не интересует, то для удобства изложения материал, формирующий неподвижную фазу, условимся именовать «сорбентом», не вкладывая в это название пока большего смысла, чем тот, что очерчен выше.

Итак, в нашем распоряжении имеется хроматографическая колонка, заполненная гранулами сорбента и находящейся между ними жидкостью (пока неподвижной), которую будем именовать элюентом. Конструкции колонок подробно описаны ниже, а пока нам достаточно представлять себе хроматографическую колонку в виде относительно тонкой и длинной трубки. Внесем мысленно в такую колонку с одного ее конца определенный объем раствора некоего вещества в том же элюенте, т. е. создадим исходную хроматографическую зону. Представим себе далее, что прошло достаточно времени для установления динамического равновесия внутри зоны. При этом будем пока пренебрегать диффузией в направлении продольного размера колонки, «размывающей» зону. Если размеры гранул сорбента действительно малы, то равновесие за счет поперечной диффузии в любом сечении зоны будет достигнуто очень быстро, поэтому такое пренебрежение не внесет существенной ошибки в рассуждения.

Эти рассуждения будут касаться распределения вещества между неподвижной фазой зоны в гранулах и (будущей) подвижной фазой — жидкостью между гранулами. Благодаря свободной диффузии и обратимой сорбции будет достигнуто динамическое равновесие, когда в неподвижной фазе окажется вполне определенная доля всего содержащегося в зоне вещества. В зависимости от соотношения объемов обеих фаз и различия в степенях сродства к ним данного вещества эта доля может быть больше или меньше.

Введем количественную характеристику равновесного распределения вещества между фазами. Пусть исходно в зону было внесено M (молей или миллиграммов) вещества и после установления равновесия с неподвижной фазой связалось количество вещества, равное M_s (в тех же единицах), а с подвижной — M_m . Их отношение K назовем *коэффициентом распределения* вещества между фазами (по-английски — distribution coefficient или capacity ratio):

$$K = M_s/M_m \quad (1)$$

Отметим, что при определении K нас не интересует «мертвый» объем, занятый самим материалом сорбента, так как подсчет идет по конечному результату сорбции — распределению всего вещества. Очевидно, что $M = M_s + M_m$.

Величина K в принципе может принимать любые положительные значения от 0 до ∞ . При $K = 0$ молекулы вещества не сорбируются и даже не входят внутрь гранул. Такая ситуация имеет место при гель-фильтрации крупных макромолекул. При $K \rightarrow \infty$ вещество практически нацело сорбировано в неподвижной фазе. Значения вблизи $K = 1$ характерны для гель-фильтрации малых молекул. Для хроматографического фракционирования при использовании сорбции любого рода, как правило, $K \gg 1$. Именно такой случай представлен на рис. 2, где штриховкой отмечена та доля материала зоны, которая связана с неподвижной фазой, а точками — доля материала, остающегося в подвижной фазе. Ширина диаграммы отвечает ширине исходной хроматографической зоны, находящейся пока в начале колонки (изображенной под диаграммой). Такой прием позволит нам ниже наглядно представить себе характер движения зоны вдоль колонки в процессе хроматографии.

В некоторых специальных случаях вводят другие, похожие по смыслу коэффициенты. Так, если вещество в неподвижной фазе находится целиком в растворе, как это имеет место при гель-фильтрации и распределительной хроматографии, то нередко пользуются величиной отношения концентраций (partition coefficient), которую тоже принято называть коэффициентом распределения: $K_D = C_s/C_m$, где C_s и C_m — концентрации вещества в неподвижной и подвижной фазах соответственно.

Для сорбции на поверхности твердого сорбента иногда используют *коэффициент адсорбции* (adsorption coefficient) $a = m_s/C_m$. Здесь m_s — масса сорбированного вещества в граммах, приходящаяся на грамм сорбента, а C_m — концентрация вещества в подвижной фазе (размерность a — обратные единицы концентрации).

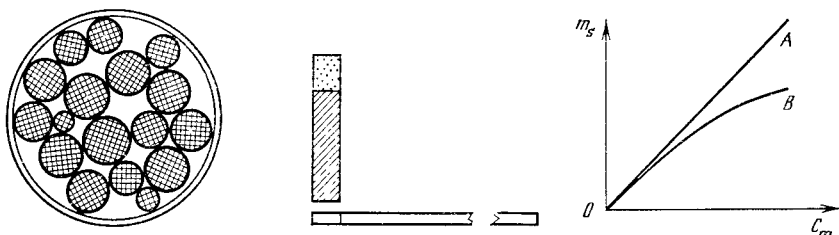


Рис. 1. Сечение хроматографической колонки, заполненной пористыми гранулами сорбента

Неподвижная фаза — внутри гранул, подвижная — жидкость между ними

Рис. 2. Диаграмма распределения вещества между неподвижной и подвижной фазами хроматографической зоны (см. текст)

Рис. 3. Линейная (А) и нелинейная (В) изотермы сорбции

До сих пор мы игнорировали вопрос о зависимости характера распределения вещества между двумя фазами от загрузки зоны, т. е. от абсолютного количества распределяющегося вещества или от концентрации его в подвижной зоне (о превышении предела растворимости при хроматографии, разумеется, речь идти не может). Естественно ожидать, что такая зависимость может иметь место в тех случаях, когда проявляется насыщение сорбционной способности сорбента. Судить об этом можно по характеру изотермы сорбции или распределения. Так называется график зависимости m_s от C_m или соответствующий график зависимости между концентрациями в двух жидких фазах. Слово «изотерма» здесь отмечает только то обстоятельство, что данные для графика следует снимать при постоянной температуре, поскольку сорбция и распределение по растворителям сильно от нее зависят. На рис. 3 показаны две изотермы распределения, линейная и нелинейная (с «насыщением»). Очевидно, что во втором случае имеет место зависимость коэффициента распределения от количества или концентрации вещества в подвижной фазе. При линейной изотерме распределение от концентрации не зависит. Впрочем, при относительно малых концентрациях и нелинейная изотерма имеет практически линейный участок. Для рассматриваемых ниже вариантов зонального фракционирования всегда стараются работать в условиях линейной изотермы. Нелинейные участки использовались в почти уже вышедших из употребления вариантах хроматографии — фронтальном анализе и вытеснительной хроматографии (впрочем, со вторым вариантом мы все же встретимся при знакомстве с тонкослойной хроматографией олигонуклеотидов). Напомним еще раз, что описанное равновесное распределение вещества между фазами устанавливается отнюдь не мгновенно, поскольку оно происходит благодаря процессам диффузии. Это обстоятельство играет важную роль в рассмотрении процесса миграции хроматографической зоны, к которому теперь можно перейти.

Миграция зоны

Представим себе, что в описанную выше колонку с того же конца, где находится исходная хроматографическая зона, начинают подавать элюирующую жидкость. Разумеется, второй конец колонки при этом открыт так, что жидкость между гранулами по всей ее длине приходит в движение. Как поведет себя зона? Будем пока по-прежнему пренебрегать продольной диффузией. На переднем по течению жидкости крае зоны подвижная фаза, покидая область равновесия, начнет поступать в прилежащий участок колонки, где неподвижная фаза еще свободна от вещества. Молекулы последнего начнут диффундировать внутрь гранул неподвижной фазы, и будет устанавливаться новое равновесие между подвижной и неподвижной фазами на этом участке. Распределение между фазами, как и ранее, будет определяться соотношением степеней сродства вещества к каждой из фаз, т. е. коэффициентом распределения K . Зона начнет расширяться, однако концентрация вещества в присоединяющемся спереди участке будет ниже, чем в исходной зоне, так как в этот участок поступает только то количество вещества, которое раньше содержалось в подвижной фазе такого же (по длине колонки) участка. В это же время из точно такого же по длине колонки участка, находящегося в конце зоны, подвижная фаза уходит вперед, а на ее место поступает чистый элюент. И здесь происходит равновесное перераспределение, на этот раз за счет вещества, прежде находившегося в неподвижной фазе, которое теперь частично десорбируется. Общая концентрация вещества в этом «арьергардном» участке зоны, очевидно, тоже начинает уменьшаться. В остальных участках, на которые можно мысленно разбить исходную зону, уходящая вперед подвижная фаза замещается точно таким же раствором подвижной фазы, поступающим из расположенных сзади участков, и равновесие не нарушается.

Описанные явления будут развиваться дальше. На следующий по ходу течения жидкости участок колонки будет поступать уже обедненная подвижная фаза, и новое равновесное распределение здесь пойдет в условиях еще меньшей концентрации вещества. В это же время на предыдущем (только что рассмотренном) участке переднего фронта произойдет замена обедненной было подвижной фазы на полноценную, поступившую из исходной зоны, и концентрация вещества на этом участке повысится. Тем временем на конечном участке зоны замена уже обедненной подвижной фазы новой порцией элюента приведет к дальнейшему снижению суммарного количества вещества. Наконец, соседний, лежащий впереди участок тоже начнет истощаться в результате замены полноценной подвижной фазы на обедненную, поступившую из конечного участка зоны.

В результате «центр тяжести» зоны сместится вперед, в то время как зона в целом начнет как бы «расплываться». Нам важно как-то оценить эту скорость смещения и характер расширения зоны и представить себе, как они зависят от условий хроматографии.

Идти дальше по пути словесного описания явлений слишком сложно, поэтому воспользуемся введенным выше приемом представления хроматографических зон с помощью диаграмм. На рис. 4 слева сверху представлена исходная зона, для которой $K = 1$ (заштрихованный и незаштрихованный участки диаграммы одинаковы). Описанные выше перераспределения вещества возникают сразу же, как только подвижная фаза начинает покидать исходную зону, и происходят непрерывно. Такую ситуацию наглядно иллюстрировать трудно. Воспользуемся обычным приемом математического анализа. Представим себе вначале, что процесс идет скачкообразно, а затем будем постепенно уменьшать величины скачков до тех пор, пока не приблизимся (в пределе) к естественному плавному течению хроматографического процесса. Для наглядности «скачки» на рис. 4 выбраны максимальными — на всю ширину хроматографической зоны. Вообразим, что вся подвижная фаза исходной зоны мгновенно перемещается на соседний участок колонки (ширина зоны сразу удваивается), а затем остается там до тех пор, пока на обоих участках за счет поперечной диффузии не установится равновесие. Результат этого скачка представлен диаграммой во второй строке левого столбца. Легко понять, что для выбранного характера распределения между фазами ($K = 1$) оба участка будут выглядеть одинаково и на каждом из них будет находиться половина исходного материала зоны, поровну распределенного между неподвижной и подвижной фазами.

Сделаем теперь второй такой же скачок, т. е. мгновенно переместим всю подвижную фазу колонки еще на один объем, равный объему исходной зоны, и снова подождем установления равновесия. Рассуждая, как описано выше, легко убедиться в том, что теперь зона приобретает форму, представленную третьей строкой левого столбца на рис. 4. Предоставим читателю проверить, что, двигаясь таким образом шаг за шагом, можно получить всю серию из восьми расположенных одна под другой диаграмм, наглядно иллюстрирующих миграцию и расширение зоны для нашей еще очень грубой модели хроматографического процесса при $K = 1$. Стрелками на диаграммах отмечены положения центра тяжести зоны, вертикальными линиями — положения ее переднего фронта. Строго говоря, зона растягивается на весь объем от начала колонки до переднего фронта зоны, но при этом на обоих концах зоны оказывается так мало вещества (в нашем примере концентрация снижается в 2^7 , т. е. в 128 раз), что реальная хроматографическая зона уходит от начала колонки и отстает от фронта течения элюента.

Теперь выясним роль выбора значения K . В правом столбце рис. 4 представлены результаты аналогичного графического анализа процесса миграции зоны для $K = 3$. Исходную общую загрузку зоны (высоту столбца диаграммы в первой строке) оставим без изменения. Уже после первого скачка, как видно из сопоставления диаграмм второй строки, появляется существенное отличие характера трансформации зоны. Теперь она уже отнюдь не однородна, хотя и стала вдвое шире. Подвижная фаза вынесла вперед лишь

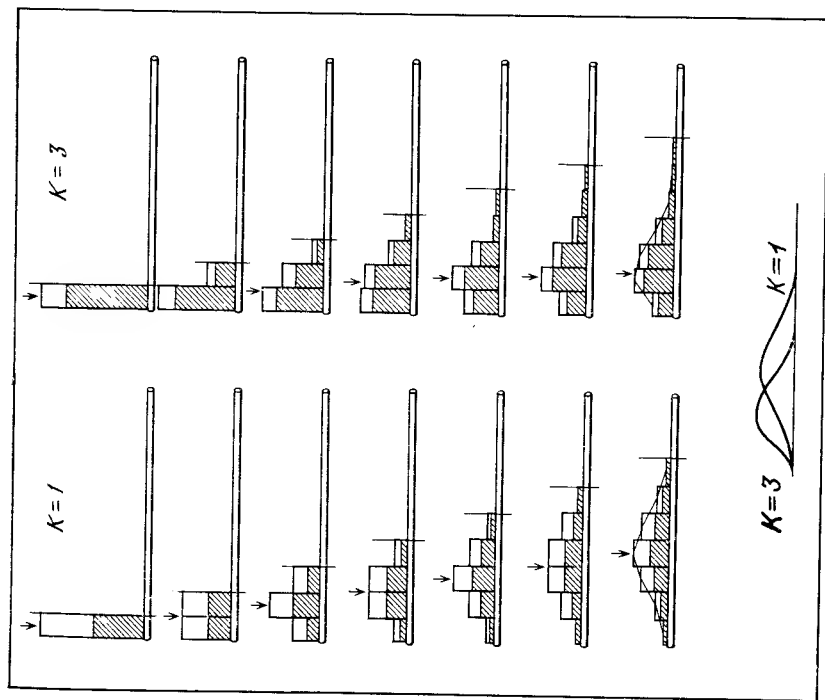


Рис. 4. Сопоставление характера миграции хроматографических зон для двух веществ, отличающихся между собой по степени сродства к неподвижной фазе (см. текст)

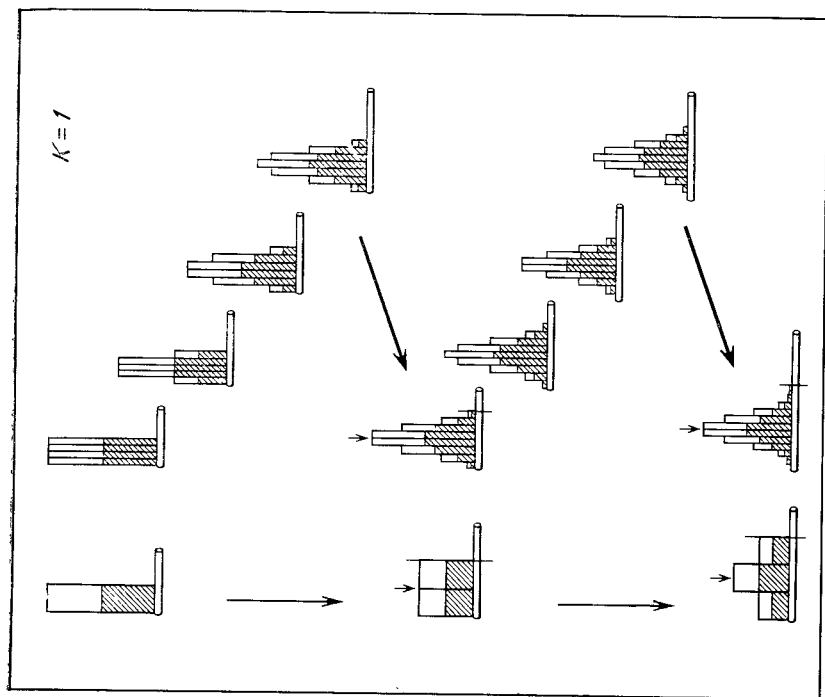


Рис. 5. Зависимость ширины хроматографической зоны от выбора величины «скачка» для модельной системы, т. е. от скорости элюции (см. текст)

$\frac{1}{4}$ вещества исходной зоны; здесь оно распределяется между фазами также в отношении 1 : 3. Соответственно участок исходной зоны лишился только $\frac{1}{4}$ части своего содержимого, и после перераспределения вещества со свежей порцией элюента его диаграмма еще не очень сильно отличается от исходной. Прodelав аналогичную манипуляцию еще шесть раз, мы приходим к результату, представленному последней строкой правого столбца, который можно сопоставить с тем же этапом «элюции» в предыдущем случае. Это сопоставление позволяет сделать важный качественный вывод: с увеличением степени сродства вещества к неподвижной фазе движение хроматографической зоны замедляется!

Фундаментальный факт замедления скорости миграции зоны с увеличением K лежит в основе любого варианта хроматографического фракционирования смеси веществ. После анализа, проведенного с помощью следующего рисунка, читатель сможет убедиться в том, что скорость миграции центра зоны не зависит от выбора величины скачков модельной системы. Из этого следует, что сделанный вывод сохраняет свою силу и для реального хроматографического процесса.

Кривыми в последней строке рис. 4 обозначены сглаженные «профили» зон для двух сопоставляемых случаев хроматографической элюции. Внизу эти профили совмещены на длине колонки. Такая картина может быть получена при внесении в исходную зону смеси двух веществ с различными коэффициентами распределения ($K = 1$ и $K = 3$). Существо проведенного рассматривания позволяет заключить, что расхождение зон будет тем заметнее, чем сильнее отличаются между собой значения K для двух компонентов смеси или, что то же, чем сильнее они различаются по степени сродства к неподвижной фазе. Проведя соответствующие измерения, легко убедиться в том, что отношение расстояния, пройденного передним фронтом элюента (вертикальная линия), к расстоянию, пройденному центром тяжести зоны (стрелка), если отсчитывать их от начала колонки, для левого столбца ($K = 1$) равно двум, а для правого ($K = 3$) постепенно приближается к четырем. Оба эти отношения можно представить в виде суммы $1 + K$. Далее мы увидим, что это отнюдь не случайно.

Тем, кто знаком с методами хроматографии, полученная картина напоминает типичное разделение хроматографических «пиков», достаточно, впрочем, плохое из-за их непомерного расширения. Однако такое расширение обусловлено не существом метода, а лишь несовершенством модели грубых скачков, как будет видно из графического анализа, иллюстрируемого рис. 5.

Здесь в левом столбце снова воспроизведены два первых этапа перемещения зоны путем грубых скачков, как на рис. 4. Ширина зоны при этом увеличивается втрое. Такое же увеличение для аналогичной исходной зоны ($K = 1$) описывают диаграммы правой части рисунка, расположенные «лестницей». Однако в этом случае скачки выбраны вчетверо меньшими, т. е. в модели элюции предполагается, что после каждого мгновенного перемещения подвижной

фазы на $\frac{1}{4}$ исходного объема происходят остановка и установление равновесного распределения между подвижной и неподвижной фазами. Диаграммы для тех моментов элюции, когда ширина зоны увеличивается вдвое и втрое, изображены рядом с соответствующими диаграммами левого столбца. Нетрудно видеть, что «расплывание» зоны существенно уменьшилось. Строго говоря, ширина зоны и в этом случае увеличилась втрое, но более 90% вещества занимает только половину ее ширины, т. е. фактически зона расширилась только в 1,5 раза. Соответственно и высота правой диаграммы последнего ряда (суммарная концентрация вещества в центре зоны) уменьшилась лишь до 80% от исходной, в то время как для левой диаграммы она упала вдвое. Между тем отмеченные стрелками положения центров тяжести зон для обеих диаграмм совершенно одинаковы.

Экстраполяция этого наблюдения к условиям очень медленного («равновесного») движения зоны позволяет утверждать, что в отсутствие продольной диффузии зона будет перемещаться, практически не деформируясь. При этом величина отставания зоны от фронта элюции останется неизменной — она зависит только от коэффициента распределения вещества между фазами. Таким образом, даже это первое, довольно грубое рассмотрение процесса хроматографической элюции позволяет сделать два практически важных заключения. Во-первых, зона вещества будет двигаться вдоль колонки тем медленнее, чем сильнее выражено сродство этого вещества к неподвижной фазе сорбента. Во-вторых, во избежание расширения зоны элюцию надо проводить достаточно медленно.

В заключение анализа динамических моделей отметим, что три кривые распределения — суммарного количества вещества вдоль зоны и его количества в неподвижной и подвижной фазах — строго подобны, так как в любом сечении зоны равновесные соотношения между ними определены значением K . Это позволит нам далее говорить о форме и характере движения вдоль колонки хроматографической зоны в целом, имея в виду суммарное количество содержащегося в ней вещества, тем более что в момент вытекания из колонки (сбора фракций) это вещество выходит в виде раствора суммарной концентрации, которая из-за отсутствия в пробирках коллектора фракций неподвижной фазы уже никак изменяться не будет. Зона при этом не деформируется, так как судьба впереди идущего, покидающего колонку участка зоны не может повлиять на характер элюции следующих за ним участков.

Рассмотрим теперь подробнее форму реально мигрирующей зоны, т. е. характер распределения вещества вдоль нее. В нижней части рис. 4 диаграммы, очерчивающие профили зоны, аппроксимированы плавными кривыми. Известно, что реальные хроматографические пики имеют колоколообразную форму. Теория показывает, а опыт подтверждает, что эта форма может быть хорошо представлена математической зависимостью, играющей центральную роль в теории статистических процессов, так называемым «распределением Гаусса». Нам необходимо познакомиться с особенностями этой зависимости поближе.

Распределение Гаусса

Рассмотрим математическую функцию $y = f(x)$ вида

$$y = \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\bar{x})^2}{2\sigma^2}}, \quad (2)$$

где A — некий постоянный множитель, σ — постоянный параметр, e — основание натуральных логарифмов ($e \approx 2,718$) и $\bar{x}$ — фиксированное значение аргумента x . Легко видеть, что для всех значений x , сильно отличающихся от $\bar{x}$, когда модуль разности $|x - \bar{x}| \gg \sigma$, величина $y \rightarrow 0$. При $x = \bar{x}$ функция имеет максимум: $y_{\max} = \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}}$.

Наконец, если $|x - \bar{x}| = \sigma$, то

$$y = \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} \frac{1}{\sqrt{e}} = \frac{y_{\max}}{\sqrt{e}} \approx 0,607 y_{\max}.$$

График такой функции представлен на рис. 6. Он представляет собой колоколообразную кривую именно такого вида, какой был рассмотрен выше для огибающей симметричной хроматографической зоны. Если представить себе, что колонка расположена вдоль оси X , а ее начало совпадает с точкой $x = 0$, то рис. 6 иллюстрирует ситуацию, когда исходная зона продвинулась на расстояние $\bar{x}$ и несколько «расплылась».

Выясним теперь смысл параметра σ и множителя A . Из графика ясно, что величиной σ можно характеризовать степень «расплывания» функции (хроматографической зоны). Чем больше σ , тем график становится шире и ниже. Если проинтегрировать функцию

Рис. 6. Распределение Гаусса (см. текст)

распределения Гаусса вдоль всей оси X , т. е. определить площадь, лежащую под кривой, то получается, что она равна просто A (для того чтобы получить этот удобный результат, в функцию был введен множитель $1/\sqrt{2\pi}$). Таким образом, множитель A характеризует площадь под кривой. Замечательно, что результат интегрирования не зависит от σ . Как бы ни «расплывалась» кривая распределения Гаусса за счет увеличения σ , ограниченная ею площадь остается неизменной. Но это как раз то, что вам нужно для описания миграции хроматографической зоны, если под A понимать суммарное количество вещества в зоне.

Величину σ принято называть *полушириной* кривой Гаусса, т. е. характеризовать ширину всей кривой величиной 2σ , измеренной на высоте $y = 0,607 y_{\max}$. Действительно, если надо как-то условиться

о характеристике ширины плавной кривой такого вида, то указанный выбор можно признать вполне удачным — в симметричный интервал 2σ попадает основная часть площади, лежащей под кривой. Кроме того, тем самым практически указывается и максимальная ширина кривой у основания — построение показывает, что ее можно принять равной 4σ , пренебрегая малозначущими «хвостами» функции, лежащими вне этого интервала. Размерность σ совпадает с размерностью аргумента распределения Гаусса. Для распределения вещества вдоль хроматографической зоны — это размерность длины. Для распределения, изменяющегося со временем, σ может иметь размерность времени.

Поскольку кривая Гаусса в теории вероятностей описывает отклонения от среднего значения некоей величины, подверженной флуктуациям, и в частности разброс ошибок измерения, то величину σ нередко именуют *стандартным отклонением* (standard deviation). Квадрат этой величины (σ^2) называют *дисперсией* (variance). Нас будет особо интересовать именно дисперсия ввиду следующего замечательного свойства распределения Гаусса, которое можно доказать методами теории вероятностей. Если имеется любое число i физических факторов, влияние каждого из которых на форму распределения может быть учтено и описано величиной σ_i , то совокупное воздействие всех этих факторов сохраняет форму распределения Гаусса, для которого величина стандартного отклонения σ оказывается связанной с σ_i зависимостью

$$\sigma^2 = \sum_i \sigma_i^2. \quad (3)$$

Иными словами, при совокупном воздействии нескольких факторов, ведущих к случайным отклонениям от средней величины, суммируются не стандартные отклонения, а дисперсии. Однако мы еще отнюдь не доказали, что профиль хроматографической зоны действительно имеет форму распределения Гаусса. Доказательство такого предположения может быть получено, если удастся записать общее уравнение миграции зоны, учитывающее все физические факторы, влияющие на ее форму, решить его и показать, что это решение имеет приведенную выше структуру функции $y = f(x)$. Это действительно удастся сделать, как будет показано в следующем параграфе.

Уравнение движения зоны

Это уравнение, а тем более его решение достаточно сложны, и приводить их здесь не имеет смысла. Читатель может найти соответствующий материал в фундаментальных монографиях [J. Morris, P. Morris, 1976; Mikeš, 1979]¹ и цитируемой там специальной литературе. Мы ограничимся общими замечаниями о том, как такое уравнение составляют и какие физические параметры реального хроматографического процесса в нем стараются учесть, затем при-

¹ См. литературу к гл. IV.

ведем решение этого уравнения и проанализируем вытекающие из него практически важные особенности поведения хроматографической зоны в ходе ее миграции вдоль колонки.

При составлении уравнения движения учитывают следующие физические особенности реального хроматографического процесса, приводящие к расширению зоны: 1) неоднородность тока жидкости в подвижной фазе (например, между гранулами могут образовываться каналы, где жидкость течет быстро, или же могут формироваться застойные зоны); 2) продольную диффузию молекул вещества в подвижной фазе; 3) продольную диффузию вещества в неподвижной фазе; 4) неравновесность распределения вещества на границе сорбирующей поверхности в неподвижной фазе; 5) неравновесность распределения вещества по объему подвижной фазы; 6) неравновесность распределения вещества по объему жидкости в неподвижной фазе (внутри гранул или в слое жидкости, сорбированной на их поверхности). Для упрощения записи условимся далее теми же цифрами обозначать параметры зоны, отражающие воздействие перечисленных факторов, т. е. слагаемые суммарной дисперсии зоны. Каждый из упомянутых физических процессов является статистическим по своей природе и, действуя отдельно, вызывает расширение зоны, подобно тому как это было показано ранее с помощью диаграмм, где, по существу говоря, объединилось действие всех факторов неравновесности распределения вещества (факторы 4—6). Воздействие каждого из процессов можно характеризовать величиной обусловленного им стандартного отклонения σ_i , а их совместное действие приведет к стандартному отклонению σ , которое можно подсчитать, суммируя соответствующие дисперсии:

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 + \sigma_4^2 + \sigma_5^2 + \sigma_6^2. \quad (3a)$$

При составлении первого уравнения движения зоны предполагают, что в начальный момент времени $t = 0$ на колонку длиной L вносят в виде очень тонкого слоя конечную массу вещества M и немедленно начинают элюцию так, что подвижная фаза перемещается вдоль колонки с линейной скоростью u , которую условимся называть скоростью элюции. Далее рассматривают бесконечно тонкий слой внутри зоны в момент t , когда максимум ее находится на расстоянии x от начала колонки. Для этого слоя составляют дифференциальное уравнение баланса, имея в виду, что скорость изменения количества вещества в неподвижной и подвижной фазах слоя (суммарно) обусловлена разностью потока вещества на границах слоя в обеих фазах с учетом диффузии. В таком уравнении фигурируют две функции, например концентрации вещества в подвижной фазе (C_m) и неподвижной фазе (C_s), и два аргумента, неявно связанные между собой, — x и t . С помощью второго уравнения, описывающего переход вещества из одной фазы в другую, первое уравнение можно преобразовать так, что оно будет записано только для одной функции, например C_m . Интересуясь формой зоны в тот момент, когда она подходит к концу колонки, можно положить $x = L$. Тогда получается дифференциальное уравнение для $C_m = f(t)$, т. е. описание того, как

изменяется концентрация вещества на конце колонки. Можно предвидеть, что эта концентрация будет равна нулю в течение некоторого времени, пока зона движется по колонке, затем будет нарастать, пройдет максимум и снова упадет до нуля в тот момент, когда зона покинет колонку.

Уравнение удастся решить, и его решение действительно имеет вид распределения Гаусса:

$$C_m = \frac{M}{S_m u \sigma_t \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t_R - t)^2}{2\sigma_t^2}}, \quad (4)$$

где S_m — площадь подвижной фазы в сечении колонки, σ_t и t_R — некие постоянные интегрирования.

Физический смысл величины σ_t пока раскрывать не будем, но отметим, что она имеет размерность времени. Символом t_R в ходе решения уравнения обозначают следующую комбинацию исходных параметров:

$$t_R = L(1 + K)u, \quad (5)$$

где K — коэффициент распределения вещества между фазами. Ясно, что при $t \ll t_R$, как и при $t \gg t_R$, концентрация вещества у конца колонки равна нулю. При $t = t_R$ распределение Гаусса имеет максимум. Физически это означает, что к моменту времени $t = t_R$ максимум хроматографической зоны достигает конца колонки. Поэтому время t_R мы вправе именовать «временем задержания вещества в колонке» (retention time), или просто «временем элюции». Так как за это время зона проходит всю длину колонки L , то для скорости миграции зоны (v) с учетом (5) можно записать выражение

$$v = L/t_R = u/(1 + K). \quad (6)$$

Таким образом, мы приходим к важному заключению о том, что хроматографическая зона мигрирует вдоль колонки со скоростью, в $(1 + K)$ раз меньшей, чем скорость элюции. Выше было показано качественно, что с увеличением K движение зоны замедляется, а на частных примерах даже обнаружилось, что оно замедляется в $(1 + K)$ раз по сравнению со скоростью движения фронта элюента. Оказывается, что это соотношение можно получить строго для реальных условий хроматографии. Отношение скоростей миграции зоны и элюции обозначают символом R и называют *фактором задержки* (чем меньше R , тем сильнее выражена задержка):

$$R = v/u = 1/(1 + K). \quad (7)$$

В случае тонкослойной хроматографии это отношение скоростей, или, что то же самое, отношение расстояний миграции пятна вещества и фронта элюента, обозначают R_F . Величина R будет тем меньше, чем больше K , т. е. чем больше сродство вещества к неподвижной фазе.

Запишем некоторые вытекающие из полученного заключения следствия. Время, необходимое для того, чтобы передний фронт элюента дошел до конца колонки (t_0), очевидно, можно подсчитать по скорости элюции и длине колонки: $t_0 = L/u$. Сопоставляя это с выражением (5), найдем, что время элюции зоны t_R в $(1 + K)$ раз больше, чем t_0 :

$$t_R = t_0 (1 + K). \quad (8)$$

По за время t_0 , очевидно, из колонки выходит вся жидкость, которая исходно находилась между гранулами, т. е. свободный («мертвый») объем колонки V_0 . Далее при неизменной скорости элюции u к моменту t_R , когда хроматографическая зона достигнет конца колонки, из последней успеет выйти объем жидкости V_R , который можно назвать «объемом элюции» зоны. Из соотношения (8) следует, что и объем элюции V_R будет в $(1 + K)$ раз больше, чем свободный объем:

$$V_R = V_0 (1 + K). \quad (9)$$

С учетом выражения (7) можно записать

$$V_R = V_0 / R. \quad (10)$$

Распределение (4), полученное при решении уравнения движения зоны, описывает ее форму как изменение концентрации вещества на конце колонки во времени. Нагляднее заменить его распределением по длине. Зона движется как целое со скоростью v . Для перехода в уравнении (4) от времен к расстояниям можно воспользоваться следующими соотношениями: $t_R = L/v$, $x = t v$. Аналогично вместо параметра σ_t можно ввести параметр σ через соотношение $\sigma_t = \sigma v$. Стандартное отклонение σ будет точно так же описывать хроматографическую зону, как и σ_t , но уже в единицах длины, т. е. позволит охарактеризовать профиль зоны по длине колонки у самого ее конца. Теперь уравнение (4) с учетом (7) можно записать так:

$$C_m = \frac{MR}{S_m \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(L-x)^2}{2\sigma^2}} \quad (11)$$

Именно этот вид уравнения позволяет раскрыть значение σ через отдельные компоненты дисперсии, фигурирующие в сумме (3). В принятых выше обозначениях при решении общего дифференциального уравнения получаются (это нам придется принять на веру) следующие выражения для слагаемых суммарной дисперсии хроматографической зоны: $\sigma_1^2 = \lambda dL$ (неоднородность тока жидкости в подвижной фазе); $\sigma_2^2 = \gamma_m D_m L$ и (продольная диффузия в подвижной фазе); $\sigma_3^2 = \gamma_s D_s L(1 - R) R u$ (продольная диффузия в неподвижной фазе); $\sigma_4^2 = R(1 - R) L u \kappa$ (неравновесность на сорбирующей поверхности); $\sigma_5^2 = \omega d^2 L u D_m$ (неравновесность в жидкости подвижной фазы); $\sigma_6^2 = \epsilon d^2 L u D_s$ (неравновесность в жидкости неподвижной фазы). Здесь λ , γ_m , γ_s , ω , ϵ — постоянные коэффициенты, d — сред-

ний диаметр гранул сорбента, D_m — коэффициент диффузии молекул вещества в подвижной фазе, D_s — то же, в неподвижной фазе, k — константа скорости реакции десорбции.

Каждая отдельная дисперсия вносит свой вклад в суммарную дисперсию, т. е. в расширение хроматографической зоны. Приведенные выражения позволяют понять характер влияния выбора параметров хроматографического процесса на ширину зоны, т. е. содержат в себе очень важную практическую информацию. Например, легко видеть, что с увеличением диаметра гранул зона расширяется как за счет неоднородности тока жидкости, так и особенно за счет неравномерности распределения молекул вещества по объемам подвижной и неподвижной фаз. Эта неравномерность будет сказываться тем меньше, чем больше значения коэффициентов диффузии D_m и D_s , т. е. чем легче диффундирует вещество. С другой стороны, облегчение диффузии (увеличение D_m и D_s) влечет за собой расширение зоны за счет продольной диффузии (особенно в подвижной фазе). Скорость элюции (u) также влияет двояким образом. С ее увеличением вклад продольной диффузии в расширение зоны уменьшается, зато сильнее сказываются все неравномерности распределения. Наконец, все факторы без исключения увеличивают дисперсию зоны пропорционально длине колонки L . Отсюда следует, что движение хроматографической зоны вдоль колонки в неидеальных условиях связано с непрерывным расширением зоны. Это должно нас насторожить в отношении целесообразности увеличения длины колонки.

Необходимо также отметить следующее: поскольку стандартные отклонения суммируются как дисперсии, т. е. в виде квадратов, то наибольшее из влияний будет резко доминировать над всеми остальными. Действительно, если, например, одно из отклонений равно 6 см, а второе — 2, то суммарное стандартное отклонение σ составит $\sqrt{36 + 4}$, т. е. около 6,3 см. Это — очень существенное замечание. Из него следует, что усилия по улучшению характеристик колонки должны быть направлены целиком на доминирующий фактор. Очень часто в качестве такового выступает неравномерность тока подвижной фазы, обусловленная разбросом размеров гранул и несовершенством набибки колонки. Особенно неблагоприятная ситуация может складываться у стенок колонки, поэтому ее диаметр должен быть по меньшей мере в 50 раз больше среднего диаметра гранул.

Очевидно, что должен существовать какой-то оптимум скорости элюции, при котором обеспечивается минимальное расширение зоны. Действительно, построение графика зависимости $\sigma^2 - f(u)$ дает всегда кривую с минимумом (рис. 7), которому и отвечает оптимальная скорость элюции. Практически ее не рассчитывают, а подбирают экспериментально по минимальному расширению хроматографического пика. Но это не делает наше теоретическое рассмотрение излишним. Оно показывает *характер* зависимости расширения зоны от скорости элюции. Из рис. 7 легко видеть, что для скоростей, не превышающих оптимальную, дисперсия очень резко (по гипер-

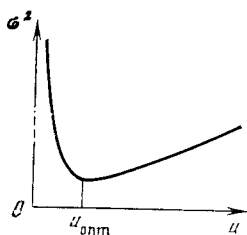


Рис. 7. Зависимость дисперсии ширины хроматографической зоны (σ^2) от скорости элюции (u)

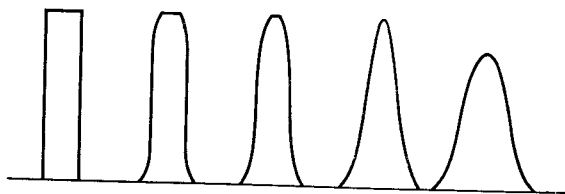


Рис. 8. Последовательные этапы деформации хроматографической зоны конечной ширины в ходе ее миграции по колонке (схема)

большинству законов) идет вверх — зона сильно расплывается за счет продольной диффузии. В отличие от этого при скоростях, больших оптимальной, рост дисперсии зоны идет умеренно (по линейному закону). Поэтому нередко имеет смысл использовать скорость элюции, в 5—6 раз большую оптимальной, и ценой незначительного расширения зон существенно уменьшить продолжительность опыта, но нельзя допускать, чтобы скорость элюции была намного ниже оптимальной. Это важный практический вывод. Можно показать, что оптимальная скорость элюции оказывается тем больше, чем выше значения коэффициентов диффузии вещества и чем меньше диаметр гранул. Уменьшение диаметра гранул снижает дисперсию зоны, улучшает разрешение пиков (см. ниже), позволяет повысить скорость и сократить время хроматографирования. Однако при этом растет гидравлическое сопротивление колонки, возникает необходимость вести элюцию при повышенном давлении и встают связанные с этим проблемы сжимаемости неподвижной фазы. Подробнее эти вопросы будут рассмотрены ниже; их успешное разрешение привело к бурному развитию за последние годы высокоэффективной хроматографии при повышенном давлении.

Отметим еще, что симметричная гауссова форма хроматографического пика реализуется только в том случае, когда поперечная диффузия и процессы сорбции—десорбции на сорбирующей поверхности более или менее успевают обеспечивать равновесное распределение вещества между фазами в ходе миграции зоны. Если этого не происходит, например при чересчур быстрой элюции, то форма пика искажается: его передний фронт оказывается крутым, а задний растягивается. Такая картина, нередко наблюдаемая на практике, может приводить к загрязнению последующего пика материалом, выходящим на «хвосте» предыдущего. Наше рассмотрение не только объясняет причину этого явления, но и указывает способ его устранения — снижение скорости элюции. Уменьшение диаметра гранул, облегчая установление равновесия, также препятствует развитию такого рода дисторсии.

В современной жидкостной хроматографии при использовании гранул с малым разбросом диаметров и хорошей набивке колонок наибольший вклад в расширение зоны и ухудшение разрешения зачастую вносит неравновесность обмена на сорбирующей поверхности. Среди компонентов дисперсии в этом случае преобладает слагаемое σ_4^2 , которое с учетом (7) можно представить так: $\sigma_4^2 = \frac{K}{(1+K)^2} \frac{Lu}{\kappa}$. Отсюда следует, что эта дисперсия имеет максимум при равномерном распределении ($K = 1$) и снижается по мере того, как распределение сдвигается в сторону неподвижной фазы ($K \gg 1$). Однако параллельно увеличивается вклад в дисперсию продольной диффузии в неподвижной фазе, поскольку, как легко видеть, величина σ_3^2 растет с увеличением K (уменьшением R). Кроме того, как явствует из выражения (6), существенно замедляется скорость миграции. На практике стараются выбирать условия хроматографии так, чтобы значение K не превышало 40—50.

В проведенном теоретическом рассмотрении было сделано предположение, что исходная зона имеет очень малую (точнее, бесконечно малую) ширину. На самом деле это не так: начальная зона имеет форму прямоугольника, который, очевидно, не может скачком превратиться в колоколообразную кривую распределения Гаусса. Вначале расширение зоны идет за счет размывания ее переднего и заднего фронтов (рис. 8). Можно доказать, что профиль каждого фронта может быть описан соответствующей половиной кривой Гаусса. Практически в большинстве случаев аналитического фракционирования хроматографические пики за время прохождения по колонке, расплываясь, успевают принять колоколообразную форму распределения Гаусса, поэтому сделанные выше качественные выводы относительно выбора скорости элюции и диаметра гранул сохраняют свою силу и для реального хроматографического процесса.

КОНЦЕПЦИЯ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ТАРЕЛОК

Введение понятия «теоретическая тарелка» базируется на том факте, что все шесть слагаемых суммарной дисперсии σ^2 содержат в качестве множителей длину колонки L . Это позволяет записать для дисперсии простое выражение: $\sigma^2 = LH$, или $\sigma = \sqrt{LH}$ (12), где

$$H = \lambda d + \gamma_m D_m / u + \gamma_s D_s (1 - R) / Ru + R (1 - R) u / \kappa + \omega d^2 u / D_m + \varepsilon d^2 u / D_s. \quad (13)$$

Из формулы (12) следует, что ширина зоны пропорциональна квадратному корню из длины пути миграции зоны вдоль колонки.

Величина H характеризует качество колонки (в любом ее сечении) в отношении дисперсии хроматографической зоны в данных условиях эксперимента. Так как стандартное отклонение σ здесь имеет размерность длины, то и H должно иметь ту же размерность.

Чем меньше величина H , тем лучше работает колонка. В современных колонках добиваются того, что $H = (1 \div 2) d$, т. е. величине H отвечает размер порядка малых долей миллиметра. Отсюда появилось наглядное представление о тонком диске, как бы вырезанном из колонки. Его образно называли «теоретической тарелкой», а величину H именуют «высотой теоретической тарелки». Исторически этот термин появился при рассмотрении модели хроматографического процесса, где непрерывную элюцию заменяли малыми скачкообразными продвижениями зоны, подобно тому как это было сделано выше в методе диаграмм. Кстати, с помощью этого метода понятию теоретической тарелки можно придать наглядный смысл. Как было установлено при сопоставлении диаграмм рис. 5, с уменьшением ширины гипотетического скачка, описывающего продвижение зоны вдоль колонки, меняется и форма зоны, в частности степень ее расширения. Представим себе, что при хроматографировании определенного вещества в реальных условиях мы экспериментальным путем нашли закон расширения зоны, а затем подобрали ширину теоретического скачка так, чтобы расширение, описываемое методом диаграмм, следовало бы точно такому же закону. Ширина этого скачка и отвечает понятию высоты теоретической тарелки H . В методе диаграмм мы не принимали во внимание продольной диффузии, однако можно себе представить, что существует более сложная модель скачкообразного движения зоны, учитывающая все факторы, ведущие к размыванию зоны. Ширина эквивалентного скачка в этой модели может служить наглядной иллюстрацией понятия о величине H .

Впрочем, всегда лучше остерегаться наглядных аналогий и не упускать из виду реальный смысл тех или иных понятий. Лучше считать, что высота теоретической тарелки H — это просто параметр хроматографического процесса, учитывающий совокупность ряда физических факторов, размывающих зону, а его размерность совпадает с размерностью длины.

Следует подчеркнуть, что высота теоретической тарелки характеризует отнюдь не только саму колонку. Из параметров собственно колонки на величину H явным образом влияет диаметр гранул (d), а неявным — коэффициент λ , значение которого сильно зависит от степени однородности набивки колонки. Однако, кроме этих параметров, высоту H определяют и выбор скорости элюции (u), и характер диффузии вещества в обеих фазах (D_m, D_s), и распределение вещества между зонами (R), и кинетика сорбции (κ). Таким образом, для разных препаратов или при разных условиях элюции одна и та же колонка может характеризоваться различными значениями H .

Передко для характеристики качества хроматографического процесса пользуются термином «число теоретических тарелок» (N), под которым подразумевают отношение длины колонки к высоте тарелки:

$$N = L/H. \quad (14)$$

Ниже будет показано, что это отношение определяет разрешающую

способность данного хроматографического процесса — именно процесса, а не только самой колонки. Подчеркиваем это еще раз, для того чтобы читатель критически относился к рекламным данным многих фирм, утверждающих, что выпускаемые ими колонки имеют столько-то тысяч теоретических тарелок, не указывая при этом, для каких веществ и в каких условиях элюции подсчитаны эти тысячи.

Число теоретических тарелок легко оценить по результатам хроматографического эксперимента. Подставив в (14) выражение для H из (12), можно записать

$$N = (L/\sigma)^2. \quad (15)$$

Вместо полуширины σ удобнее использовать полную ширину пика у его основания (W). Выше было отмечено, что для распределения Гаусса $W \approx 4\sigma$, тогда

$$N = 16 (L/W)^2. \quad (16)$$

Истинная ширина хроматографического пика на колонке экспериментатору неизвестна (ее не следует путать с шириной пика на ленте регистратора — эта ширина зависит от скорости движения ленты). Однако нетрудно перейти к величинам, доступным для измерения, а именно к объему элюента, в котором выходит хроматографический пик (V_P), и ранее рассмотренному объему элюции (V_R), т. е. объему элюента, вышедшему из колонки с момента начала хроматографического процесса до момента выхода пика. Выше мы обозначили скорость движения хроматографической зоны по колонке символом v . Очевидно, что продолжительность выхода пика вещества из колонки $t_P = W/v$. За это время элюент вытекает из колонки со скоростью u . Отсюда следует, что $V_P = Wu/v$. Продолжительность миграции хроматографической зоны вдоль длины колонки $t_L = L/v$, а объем элюции $V_R = Lu/v$. Теперь можно подставить в (16) выражения $L = V_R v/u$ и $W = V_P v/u$ и получить практически удобную формулу для определения числа теоретических тарелок:

$$N = 16 \left(\frac{V_R}{V_P} \right)^2. \quad (17)$$

Иногда в целях получения более концентрированного раствора очищенного вещества предпочитают отобрать не весь пик, а ту (основную) его часть, которая лежит между ординатами, соответствующими половине высоты пика. Если объем этой части обозначить $V_{0,5}$, то выражение (17) с учетом формы распределения Гаусса изменится на аналогичное, но с другим коэффициентом:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_R}{V_{0,5}} \right)^2. \quad (18)$$

Вместо объемов в формулы (17) и (18) можно подставить соответствующие времена: время задерживания зоны на колонке и продолжительности выхода всего пика или основной его части. Остается добавить, что все эти измерения и расчеты будут более или менее корректными, если объем исходной зоны мал по сравнению с объе-

мом выходящего пика (практически этот объем обусловлен именно неидеальностью хроматографического процесса). Так будет в том случае, когда количество исходного материала невелико и он хорошо сорбируется в верхней части колонки.

РАЗРЕШЕНИЕ БЛИЗКО МИГРИРУЮЩИХ ЗОН

Целью хроматографического эксперимента в аналитическом его варианте является разделение («разрешение») в ходе миграции вдоль колонки или пластинки хроматографических зон, содержащих чистые компоненты фракционируемой смеси веществ. Эти зоны или (в случае широких зон) их передний и задний фронты имеют форму кривых распределения Гаусса. Естественно задать вопрос: при каком минимальном расстоянии между зонами разрешение можно считать удовлетворительным?

Обозначим Δx расстояние между максимумами двух соседних зон, описываемых распределением Гаусса (рис. 9). Разрешением (R_s) двух таких зон называют следующее отношение:

$$R_s = \frac{\Delta x}{4\sigma}. \quad (19)$$

Так как ширина кривой Гаусса у основания приближенно равна как раз 4σ , то полуширина зоны (или ширина фронта широкой зоны у ее основания) равна 2σ . Для двух соседних зон величину стандартного отклонения σ можно считать одинаковой, поэтому минимальное значение разрешения, при котором зоны можно физически разделить, равно единице ($R_s = 1$). Можно показать, что при этом взаимное загрязнение зон (одинаковой амплитуды) за счет «хвостов» кривых Гаусса составляет примерно 2,3%.

Найдем зависимость разрешения от параметров хроматографического процесса. На рис. 9 показаны две соседние зоны, максимумы которых в некий момент времени t (считая от начала элюции) мигрировали на расстоянии x_1 и x_2 . Если скорости их миграции обозначить v_1 и v_2 , а факторы задержки (см. формулу 7) — соответственно R_1 и R_2 , то очевидно, что $\Delta x = x_2 - x_1 = v_2 t - v_1 t = ut(R_2 - R_1) = ut\Delta R$. В среднем для двух близких зон можно считать, что $ut = vtR = x'R$. Таким образом, $\Delta x = x\Delta R/R$. К концу колонки ($x = L$) расхождение зон достигает максимума:

$$\Delta x = L \frac{\Delta R}{R}. \quad (20)$$

Таким образом, расхождение максимумов зон к концу миграции пропорционально длине колонки, степени различия в сродстве двух веществ к неподвижной фазе (ΔR), и тем больше, чем меньше R . т. е. чем сильнее само это сродство. Формулу (19) для разрешения с учетом (12) теперь можно записать так:

$$R_s = \frac{L \cdot \Delta R}{R \cdot 4 \sqrt{LH}} = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L}{H}} \frac{\Delta R}{R}. \quad (21)$$

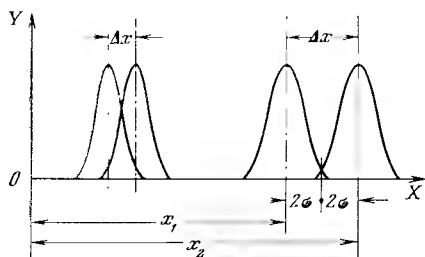


Рис. 9. Расстояние между узкими хроматографическими зонами, мигрирующими по колонке (слева направо)

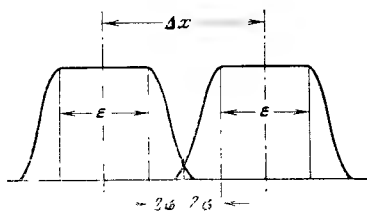


Рис. 10. Расстояние между широкими хроматографическими зонами с «площадкой»

Отсюда следует, что разрешение близких зон пропорционально квадратному корню из длины колонки. Этого следовало ожидать, поскольку одновременно с расхождением максимумов зон (пропорционально L) происходит их расширение (пропорционально $\sqrt{L}$). Таким образом, если мы хотим вдвое улучшить разрешение соседних зон, придется увеличить длину колонки в четыре раза.

Из формулы (21) следует, что улучшать разрешение эффективнее не за счет длины колонки, а за счет выбора хроматографической системы, обеспечивающей более выраженное различие сродства двух веществ к неподвижной фазе. Следует подчеркнуть, что если хроматографическая система разделения близких зон отработана на малой колонке, то при переносе ее на колонку большего размера следует увеличивать объем только за счет ее диаметра, оставив подобранную длину колонки неизменной. Скорость элюции (мл/ч) следует повысить пропорционально увеличению площади сечения колонки, с тем чтобы линейная скорость течения подвижной фазы (или, что то же самое, расход элюента в расчете на 1 см^2 площади сечения колонки) оставалась неизменной.

Выражение (21) можно записать, используя N — число теоретических тарелок: $R_s = 1/4 \sqrt{N} \Delta R/R$. Отсюда видно, каким образом число теоретических тарелок характеризует разрешающую способность хроматографического процесса.

До сих пор мы считали зону чисто гауссовой, молчаливо пренебрегая протяженностью исходной зоны и как следствие возможностью наличия «площадки» на профиле мигрирующей зоны (рис. 10). Ширина переднего и заднего фронтов зоны у ее основания равна 2σ , и если к концу колонки близкие соседние зоны еще сохраняют площадку шириной ϵ , то минимальное расстояние между зонами, отвечающее их разрешению, будет составлять $\Delta x = 4\sigma + \epsilon$. В препаративных вариантах хроматографии бывает, что $\epsilon \gg \sigma$. В таких случаях расширение фронтов зон можно не учитывать, а условие разрешения записать проще: $\Delta x \gg \epsilon$. Разрешение в этом случае лучше представить себе как $R' = \Delta x/\epsilon$. Оно пропорционально длине колонки (за счет Δx), а не корню из ее длины.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

В большинстве случаев перед хроматографическим процессом стоит задача надежного разделения двух или более заранее известных компонентов исходной смеси. Если хроматографическая система уже определена, то в распоряжении экспериментатора еще остается возможность выбора целого ряда физических параметров процесса с целью оптимизации условий разрешения зон (пиков) в этой системе. Краткое знакомство с основами теории хроматографии имело целью дать обоснования для такого выбора. Теперь можно подвести итоги. Последовательно рассмотрим следующий ряд параметров: геометрия колонки, размер гранул, набивка колонки, скорость элюции, физические свойства элюента (вязкость, температура) и, наконец, загрузка колонки. Рассмотрение будем вести с позиции улучшения разрешения и одновременно уменьшения продолжительности хроматографического процесса. Но сначала надо привести еще одну зависимость — скорости элюции u от разности давлений на входе и выходе колонки ΔP («перепад давления») и от размера гранул. Ее описывает уравнение Дарси:

$$u = k \frac{d^2}{\eta} \frac{\Delta P}{L}, \quad (22)$$

где η — вязкость жидкости, а k — постоянный множитель, значение которого зависит от формы гранул (мы будем считать их сферическими). Теперь приступим к обоснованию выбора перечисленных параметров.

Геометрия колонки

Минимальная длина колонки, необходимая для разрешения близких зон, может быть найдена из уравнения (21), если в нем положить $R_s = 1$; тогда $L = 16H (R \Delta R)^2$. Выше упоминалось, что для хорошей колонки можно достичь соотношения $H \approx 2d$, тогда для оценки необходимой длины L можно записать: $L \geq 32d (R \Delta R)^2$. Нагляднее записать это соотношение через коэффициенты распределения вещества K , подставив $R = 1/(1 - K)$ и $\Delta R \approx \Delta K (1 - K)^2$:

$$L \geq 32d \left(\frac{1+K}{\Delta K} \right)^2 \quad (23)$$

Отсюда следует, что колонку надо брать тем длиннее, чем крупнее гранулы, чем больше степень сродства вещества к неподвижной фазе (K) и чем меньше различие между степенями этого сродства для двух разделяемых компонентов смеси (ΔK). Значения K для компонентов фракционируемой смеси веществ редко бывают известны, и длину колонки обычно подбирают опытным путем. Но коль скоро она подобрана, характер необходимых изменений этой величины при переходе к гранулам другого размера или к веществам с иными значениями коэффициентов распределения из выражения (23) становится ясным.

Для слишком длинной колонки поддержание оптимальной скорости элюции может потребовать чересчур большого перепада давлений. Действительно, из (22) следует очевидный вывод, что необходимый перепад давлений ($\Delta P = uL\eta k d^2$) прямо пропорционален длине колонки. С этой точки зрения необходимо оценить возможности имеющегося насоса и опасность деформации гранул используемого сорбента; к этим проблемам мы вернемся ниже.

Диаметр колонки нигде не входил в наше теоретическое рассмотрение. В идеальном случае он и не должен сказываться ни на одной из рассмотренных характеристик процесса: ни на скорости миграции, ни на форме зон, ни на разрешении. Действительно, колонку, площадь сечения которой в 100 раз превышает площадь сечения другой колонки (при идентичности всех прочих параметров, включая длину), можно рассматривать как 100 колонок меньшего диаметра, собранных параллельно, в один «пучок». В реальных случаях, однако, выбор сечения колонки сказывается, разумеется, на характеристиках хроматографического процесса. С одной стороны, диаметр колонки должен не менее чем в 50 раз превышать диаметр гранул, иначе упомянутое ранее влияние стенок колонки может вызвать заметное расширение зоны. С другой стороны, колонки диаметром более 2 см отличаются худшими характеристиками за счет неоднородностей тока жидкости в них, ведь при набивке их сорбентом трудно обеспечить равномерность его распределения по всему сечению. Заметим попутно, что эти трудности особенно сильно выражены при гель-фильтрации, где зоны движутся очень близко друг за другом. Тем не менее диаметр колонки нередко заметно увеличивают ради большей загрузки препаратом, с тем чтобы при этом сохранить малой ширину исходной зоны. Для аналитических колонок, работающих в режиме «изократической» (пегradientной — см. ниже) элюции, отношение длины колонки к ее диаметру обычно лежит в пределах 20—100.

Размер гранул

Выше было подчеркнуто, что с уменьшением диаметра гранул d условия хроматографии заметно улучшаются: уменьшается высота теоретической тарелки (H), а с ней — и дисперсия зон (см. 12), увеличивается разрешение (см. 21), повышается оптимальная скорость элюции. Однако за все это надо расплачиваться сильным ростом необходимого перепада давления (ΔP).

Если в выражение (22) подставить значение $u = u_{\text{опт}}$, найденное путем решения уравнения $db^2/du = 0$, то получим:

$$\Delta P \propto k' \frac{D_n \eta L}{a^3}. \quad (24)$$

Отсюда видно, что необходимый перепад давления растет пропорционально третьей степени уменьшения диаметра гранул (например, при уменьшении диаметра втрое перепад давлений необходимо увеличить в 27 раз). Это предъявляет новые, повышенные

требования к конструкции насосов, колонок, подводящих трубок и их сочленений, а также к жесткости самих гранул (сжатие гранул ведет к их деформации, заполнению свободной площади сечения и закупориванию колонки). Однако как только возникла необходимость ускорения хроматографического анализа (например, для экспресс-анализа в заводских условиях), указанные повышенные требования удалось выполнить. Была разработана новая техника хроматографии при высоком давлении, которую выше условились обозначать ЖХВД. Соответствующая аппаратура описана в следующей главе. Диаметр гранул для ЖХВД оказалось возможным снизить до 5—10 мкм, что позволило использовать колонки диаметром 2—5 мм и уменьшить продолжительность хроматографического разделения до десятков минут; при этом используют перепады давления порядка сотен атмосфер (см. ниже). Существенного снижения эффективного размера гранул неподвижной фазы и улучшения разрешения без необходимости очень сильного повышения давления можно добиться путем использования в качестве неподвижной фазы сплошных (не пористых) гранул с сорбированным или химически закрепленным на них тонким слоем жидкости. К сожалению, при этом происходит снижение емкости колонки.

Набивка колонки

Опыт показывает, что в случае неплавающих (и несжимаемых) гранул на основе спликагеля или пористого стекла наилучшие результаты нередко дает заполнение колонки сухими гранулами. Колонку при этом следует потряхивать или постукивать по ней. Первое заполнение ее жидкостью следует вести снизу вверх, вытесняя воздух. Матрицы и сорбенты на основе целлюлозы или сефадекса нельзя вносить в сухом виде — им следует предварительно дать набухнуть. Для заполнения предпочтительно использовать суспензию гранул в воде или буфере в виде густой кашицы («slurry»). О влиянии концентрации соли в момент заполнения и прочих технических приемах этого важного подготовительного этапа хроматографии будет подробно сказано ниже. Во всех случаях следует избегать свободного осаждения гранул из суспензии во время заполнения колонки, ибо это приведет к распределению частиц по размерам как в продольном направлении, так и по сечению колонки, что обуславливает неоднородность последующего тока подвижной фазы. То же самое относится и к возможности возникновения конвекционных токов в жидкости. После заполнения фазам в колонке надо дать уравновеситься при рабочей скорости элюции и соответствующем перепаде давления.

Скорость элюции

Выше было введено понятие оптимальной скорости элюции. С помощью теории миграции хроматографической зоны можно получить выражение для $u_{\text{опт}}$; в первом приближении оно сводится

к очень простой зависимости $u_{\text{опт}} \approx D_m' d$, где D_m — коэффициент диффузии вещества в подвижной фазе, а d — средний диаметр гранул. Для низкомолекулярных веществ в водных растворителях можно принять, что $D_m \approx 10^{-5}$ см²/с. Тогда для колонки, заполненной гранулами со средним диаметром 80 мкм (200 МЕШ), $u_{\text{опт}}$ составит $1,25 \cdot 10^{-3}$ см с или 4,5 мл ч на 1 см² сечения колонки. Уже упоминалось, что ввиду пологого характера правой ветви кривой (см. рис. 7) рабочую скорость элюции можно брать в 5–6 раз выше, чем $u_{\text{опт}}$, т. е. примерно 20–30 мл ч · см². Для колонок ЖХВД с гранулами диаметром 10 мкм рабочую линейную скорость можно увеличить до $5 \cdot 10^{-2}$ см/с, т. е. до 3 см/мин. При обычной высоте колонки (25 см) это позволяет проводить хроматографическое фракционирование за 8–10 мин.

Физические свойства элюента

Решающую роль здесь играет вязкость η , с увеличением которой уменьшаются значения обоих коэффициентов диффузии, D_m и D_s . Соответственно уменьшается вклад в дисперсию продольной диффузии и увеличивается вклад неравновесности распределения. Кроме того, повышение вязкости, согласно выражению (24), требует соответственного роста перепада давления со всеми вытекающими отсюда последствиями.

Изменение температуры дает сложный эффект. С ее повышением снижается вязкость элюента, но, что более существенно, может изменяться и характер взаимодействия вещества с неподвижной фазой, т. е. величина K (как правило, она уменьшается). Иногда это используют для управления элюцией (градиент температуры), о чем будет сказано ниже. С увеличением температуры и уменьшением вязкости среды растут значения обоих коэффициентов диффузии. Влияние этих изменений на форму зоны зависит от того, какие слагаемые суммы, определяющей суммарную дисперсию в выражении (3а), преобладают. Для жидкостной хроматографии — это чаще слагаемые, описывающие неравновесность (σ_5^2 и σ_6^2), чем те, которые обусловлены продольной диффузией (σ_2^2 и σ_3^2), поэтому повышение температуры хроматографического процесса нередко ведет к улучшению разрешения. Особенно это существенно для макромолекул — как за счет увеличения D_s , так и за счет уменьшения степени связывания с неподвижной фазой, которое нередко бывает многоточечным и ввиду этого чрезмерно прочным. К сожалению, хроматография макромолекул при повышенной температуре не всегда возможна ввиду их лабильности.

Загрузка колонки

В целях наилучшего использования разрешающей возможности колонки ширина исходной зоны должна быть минимальной. Это не обязательно означает, что объем раствора препарата, вносимого на колонку, должен быть мал. Такое заключение справедливо

только для гель-фильтрации, где сорбция препарата в неподвижной фазе отсутствует. Если же сродство хроматографируемого вещества к неподвижной фазе велико, как, например, при ионообменной хроматографии, то узкая исходная зона на верхнем конце колонки образуется сама в процессе нанесения препарата даже из большого объема разбавленного раствора.

С другой стороны, следует проявлять осторожность при внесении на колонку препарата в виде концентрированного раствора.

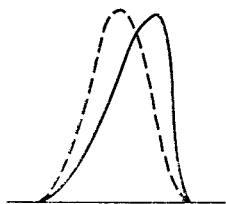


Рис. 11. Деформация хроматографической зоны в случае ее перегрузки

Деформированная зона изображена сплошной линией

Помимо проблемы повышенной вязкости такого раствора, не исключено, что условия в исходной зоне будут отвечать нелинейной части изотермы распределения, что весьма неблагоприятно скажется на разрешении. Действительно, в таком случае коэффициент распределения K будет изменяться по ширине зоны. В ее середине, где концентрация вещества в подвижной фазе заведомо превышает ту, которой отвечает линейный участок изотермы (см. рис. 3), значение K будет меньше, чем по краям зоны, где эта концентрация соответствует линейному участку. Из формулы (6) следует, что центральная часть зоны при этом будет мигрировать вдоль колонки быстрее, чем ее края.

В результате зона деформируется (ее передний фронт будет становиться все более крутым, а задний — растянется) и приобретет профиль, изображенный на рис. 11. Можно показать, что расширение зон при такой миграции будет выражено больше, а разрешение станет соответственно хуже, чем в том случае, когда зоны сохраняют форму распределения Гаусса. Описанный процесс деформации зоны с образованием размытого «хвоста» («trailing») часто встречается в хроматографической практике. Только что было показано, что эта деформация может быть следствием перегрузки зоны, однако ранее мы встречались с аналогичной картиной в случае слишком большой скорости элюции. Разрешить эту альтернативу практически легко — достаточно уменьшить скорость элюции при той же загрузке колонки.

ГРАДИЕНТНАЯ ЭЛЮЦИЯ

Выше мы молчаливо предполагали, что условия распределения и значения K остаются неизменными для каждой зоны фракционируемых веществ в течение всего их движения вдоль колонки. Для этого достаточно, чтобы распределение вещества между фазами подчинялось закону линейной изотермы, а состав и температура элюента не изменялись в ходе элюции до самого ее конца. Такой процесс именуется «изократической» элюцией.

С ее помощью, подобрав оптимальные условия, можно добиться наилучшего разрешения двух соседних, близко расположенных

друг к другу зон, т. е. разделить два близких по своим хроматографическим характеристикам компонента исходной смеси веществ. То же справедливо и для n компонентов, если различия их характеристик нарастают постепенно. В этом случае соответствующие зоны мигрируют по колонке без разрыва, одна за другой, а хроматографические пики будут более или менее равномерно распределены по полному объему элюции ($V_{R_n} - V_0$), где V_{R_n} — объем элюции последнего компонента смеси.

Однако ситуация коренным образом меняется, если компоненты исходной смеси разбиваются на группы, существенно различающиеся между собой по степени сродства к неподвижной фазе (K), а следовательно, и по скорости миграции. Очевидно, что такие компоненты будут выходить из колонки соответствующими группами, разделенными значительными объемами «пустого» элюента. Это неоправданно затягивает хроматографический процесс и ведет к ухудшению разрешения внутри позади идущих групп в результате диффузии. Но этим не исчерпываются неблагоприятные последствия описываемой ситуации. Очевидно, что она не позволяет выбрать состав элюента и другие параметры элюции таким образом, чтобы они оказались оптимальными для различных групп компонентов, как это видно из рис. 12. В случае *A* условия элюции оптимальны для компонентов группы 2, и они хорошо разрешаются, но для компонентов группы 1 элюент оказывается слишком сильным: среднее для этой группы значение K будет мало, R — соответственно велико, а разрешение R_s , согласно (21), окажется малым. Компоненты группы 1 покинут колонку, не успев отделиться друг от друга. В случае *B* условия элюции оптимальны для группы 1, зато компоненты группы 2 будут выходить замедленно, в виде очень расплывшихся пиков; их разрешение тоже окажется неудовлетворительным.

Решение проблемы лежит в переходе к градиентной элюции, обуславливающей изменение (уменьшение) значений коэффициентов распределения (K) системы компонентов в ходе самой элюции. Это осуществляется за счет изменения состава (или температуры) элюента, как подробно описано ниже для каждого типа хроматографии. Элюцию начинают в условиях, оптимальных для разделения компонентов наиболее слабо связанной группы 1. Когда такое разделение будет достигнуто (в ходе него группа 2 остается почти неподвижной), можно сменить элюент на более сильный, отвечающий оптимальным условиям разделения компонентов группы 2. При этом вовсе не обязательно дожидаться выхода компонентов группы 1 из колонки. Когда фронт сильного элюента достигнет эти компоненты (уже разделившиеся) где-то на колонке, он их «подхватит» и почти без задержки вынесет наружу.

Изменение эффективности, или «силы» элюента, может происходить скачкообразно, путем замены одного элюента другим; такой процесс именуют «ступенчатой элюцией». Кроме того, можно (с помощью специальных устройств, описанных ниже) обеспечить постепенное увеличение силы элюента, поступающего в колонку. Элюцию такого типа обычно называют просто градиентной элюцией.

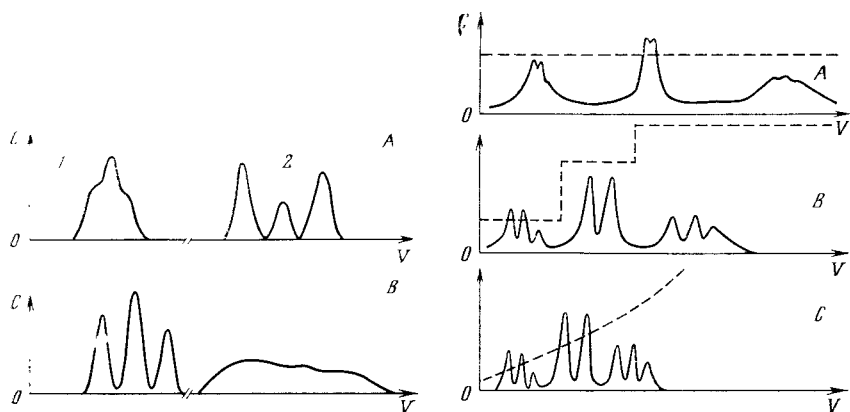


Рис. 12. Влияние выбора силы элюента при изократической элюции на характер разрешения компонентов смеси, принадлежащих к различным по прочности сорбции группам (см. текст)

V — объем элюции;

C — концентрация веществ

Рис. 13. Сопоставление характера разделения смесей компонентов, входящих в состав трех различных по прочности сорбции групп, при изократической элюции (A) и элюции ступенчатым (B) или непрерывным (C) градиентом силы элюента

Пунктирная линия отражает изменения концентрации элюирующего агента; остальные обозначения — см. рис. 12

Легко понять, что при градиентной элюции хроматографические зоны должны сужаться («обостряться»). Действительно, поскольку сила элюента, поступающего в колонку, все время увеличивается, то такое постепенное и непрерывное увеличение будет иметь место и вдоль всей ее длины. Следовательно, и внутри любой хроматографической зоны эффективность элюции будет парастать от переднего ее фронта к заднему. Это означает, что расположенные позади участки зоны должны мигрировать несколько быстрее, чем участки, идущие впереди, — зона сжимается, «подтягивает хвост». Кстати, это наводит на мысль, что градиентная элюция должна давать особенно благоприятный эффект в случае нелинейной изотермы распределения и в других случаях, когда задний фронт мигрирующей зоны размывается, образуя «хвост». Такое заключение подтверждается практикой.

Обострение зоны в ходе градиентной элюции будет продолжаться до тех пор, пока изменение силы элюента на длине суженной зоны не окажется уже слишком малым, чтобы воспрепятствовать расширению зоны за счет продольной диффузии и неоднородностей течения подвижной фазы. Следует ясно отдавать себе отчет в том, что (в случае линейной изотермы распределения) *градиентная элюция не дает выигрыша в разрешении близко идущих зон*. Одновременно с описанным сужением зоны каждого компонента уменьшаются и расстояния

между этими зонами, так что характер разрешения хроматографических пиков внутри каждой группы близко идущих компонентов на выходе из колонки целиком определяется средней силой выходящего вместе с ними элюента. В то же время для разных групп пиков значения средней силы элюента могут быть весьма различными, что позволяет обеспечивать оптимальные условия фракционирования компонентов внутри каждой группы.

Выбор между ступенчатым и непрерывным законами изменения силы элюента диктуется в первую очередь степенью различия по сродству к неподвижной фазе между группами компонентов и внутри них. Если различия между группами очень велики, то предпочтение следует отдать ступенчатому градиенту (рис. 13). Конечно, можно задать столь крутой закон постепенного (например, линейного) нарастания силы элюента, что эти группы окажутся достаточно сближенными, но разрешение пиков внутри групп при этом может пострадать, так как предел сужению зон внутри группы кладет диффузия вещества и неоднородность, в то время как уменьшение расстояния между зонами с ростом крутизны градиента ничем не ограничено. Однако, прежде чем в каждом конкретном случае сделать выбор между ступенчатой и непрерывной градиентными элюциями, следует принять во внимание целый ряд чисто практических соображений, которые изложены ниже в форме сжатого перечисления достоинств и недостатков обоих типов градиентной элюции.

Достоинства ступенчатой элюции. 1. Простота и воспроизводимость. 2. Равновесные условия элюции легче реализуются на каждой ступени, где характеристики элюента остаются неизменными. Это приводит к лучшему разрешению пиков, а сила (например, концентрация) элюента нередко может быть ниже, чем при непрерывной градиентной элюции.

Недостатки ступенчатой элюции. 1. Возможность появления ложных пиков в тех случаях, когда в ходе одной ступени элюции зона растягивается и дает «хвост», иногда даже незаметный: при резком переходе к следующей ступени элюции остаточный материал этого хвоста элюируется в виде острого и потому хорошо заметного пика. 2. Очень плохое разрешение в окрестностях ступени смены элюента. Если эта ступень попадает не на «пустое» место, а захватывает некоторое число компонентов, которые могли бы быть элюированы и при меньшей силе элюента, то все они будут элюироваться в виде одной неразрешенной острой зоны.

Преимущества непрерывной градиентной элюции. 1. Автоматическое и постепенное перекрывание очень широкого диапазона силы элюента предоставляет максимально полные возможности для обзорного анализа всей совокупности компонентов исходной смеси веществ. 2. Максимальное сокращение объема элюента и соответственно продолжительности хроматографического процесса. 3. Возможность варьирования формы градиента (см. ниже).

Недостатки непрерывной градиентной элюции. 1. Имеется опасность плохого разрешения (или даже неразделения) зон двух близких по своим хроматографическим свойствам компонентов, если

профиль градиента окажется слишком крутым. 2. Труднее, чем при изократическом или ступенчатом вариантах, удастся обеспечить воспроизводимость всего процесса элюции, особенно если в образовании градиентной смеси участвуют растворы, различающиеся по плотности.

Суммируя, можно сказать, что непрерывную градиентную (особенно линейную) элюцию следует предпочесть для предварительного обследования возможностей хроматографической системы и для многих аналитических фракционирований. Ступенчатая элюция обычно лучше служит целям препаративного разделения или употребляется в тех случаях, когда обеспечение воспроизводимости процесса элюции выступает на первый план.

Заметим, что нередко наилучший режим хроматографии можно получить не с линейным, а с вогнутым градиентом, когда сила элюента резко увеличивается к концу элюции (рис. 14). Это обусловлено тем, что нарастание степени сродства к сорбенту в ряду компонентов смеси очень часто происходит по аналогичному, нелинейному, закону.

Очевидно, что чем круче профиль градиента, тем сильнее сближаются удаленные друг от друга группы хроматографических пиков.

В то же время для успешного разделения пиков внутри группы может потребоваться пологий градиент. Разрешить это противоречие можно путем создания непрерывных градиентов более сложной формы, где крутые участки сменяются пологими. Технически это оказывается не слишком сложной задачей (см. ниже). Необходимо отметить, что разрешение при градиентной элюции, в отличие от изократической, улучшается с увеличением длины колонки лишь до определенного предела. С того момента, как элюент нарастающей силы (например, раствор соли достаточно высокой концентрации) «догоняет» мигрирующие впереди компоненты смеси и практически нацело переводит их в подвижную фазу, дальнейшее перемещение этих компонентов по колонке с током элюента ($v = u$) уже не улучшает, а только ухудшает их фракционирование за счет продолжающейся продольной диффузии.

ХРОМАТОГРАФИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Макромолекулы отличаются от малых молекул не только размерами, но и лабильностью, которая в первую очередь связана с тем, что биологическая активность многих из них (например, ферментов) обусловлена третичной структурой, в образовании которой решающую роль играют слабые силы взаимодействия между достаточно удаленными друг от друга участками полипептидной или полинуклео-

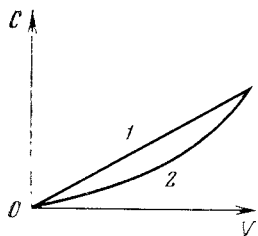


Рис. 14. Линейная (1) и вогнутая (2) формы непрерывного градиента

Обозначения — см. рис. 12

тидной цепи. Кроме того, биологические макромолекулы являются полиэлектролитами, что в случае ионных взаимодействий с сорбентом приводит к многоточечному контакту. Часто на их поверхности мозаично расположены гидрофобные и гидрофильные участки, а также центры сорбции. Биологическая активность многих ферментов связана с сохранением четвертичной структуры, когда белковая молекула состоит из нековалентно связанных между собой субъединиц.

Термином «денатурация» обычно обозначают утрату макромолекулами четвертичной, третичной или вторичной структурных организаций. Такая утрата может происходить в ходе самого хроматографического процесса — как в результате воздействия элюента (экстремальные значения pH, высокие концентрации соли, возможность окисления), так и вследствие многоточечной сорбции, когда макромолекулы как бы «распластываются» на поверхности сорбента. При этом слабые связи между участками их цепей разрываются. Денатурация, как правило, приводит к увеличению молекулярного объема и к экспонированию гидрофобных участков, особенно у белков, где эти участки в большинстве своем укрыты от контакта с водно-солевой средой клетки, располагаясь внутри белковых глобул. Такие изменения при денатурации влияют на распределение макромолекул между подвижной и неподвижной фазами. Это влияние нередко бывает неблагоприятным, поскольку развернутые полипептидные или полинуклеотидные цепи склонны очень прочно, а иногда и необратимо сорбироваться в неподвижной фазе. Даже при отсутствии какой-либо сорбции, например при гель-фильтрации, увеличение молекулярного объема при денатурации может приводить к задержанию молекул внутри гранул, откуда они в нативном состоянии могли свободно диффундировать. Экспонирование гидрофобных участков может приводить к нежелательному взаимодействию фракционируемых молекул с самим материалом матрицы (полимерной сетки), образующей каркас гранул неподвижной фазы.

Для уменьшения опасности денатурации нередко приходится вести хроматографию белков при пониженной температуре или вводить в состав элюента глицерин в качестве консерванта, что приводит к увеличению вязкости жидкостей подвижной и неподвижной фаз, требует повышения рабочего давления и нередко ухудшает разрешение за счет затруднения диффузии (см. выше). С уменьшением коэффициентов диффузии снижается и допустимая скорость элюции, увеличивается продолжительность хроматографического процесса, а вместе с ней — и вероятность денатурации. В этом плане ступенчатая градиентная элюция нередко оказывается заметно более выгодной, чем непрерывная. Большой размер макромолекул, даже нативных, обуславливает существенное уменьшение коэффициентов диффузии по сравнению с малыми молекулами (для приблизительно сферических макромолекул хорошо выполняется закон Стокса: $D = \frac{1}{6\pi\eta r}$, где r — радиус сферы; для несферических роль r играет характеристический линейный размер). Так, у белков значения D_m и D_s в 10—30 раз меньше, чем, например, у аминокислот, а для

очень крупных молекул (РНК и ДНК) эти значения существенно меньше. Следовательно, расширение зон и ухудшение разрешения пиков при хроматографии макромолекул обусловлены главным образом трудностью установления равновесия обмена между фазами. Это обстоятельство, в свою очередь, требует уменьшения скорости элюции. Продольная диффузия большой роли здесь не играет.

В тех случаях, когда (при достаточно малых размерах гранул) скорость элюции за счет повышенного давления удастся увеличить, не следует забывать о возможности денатурации макромолекул в результате их сжатия под высоким давлением.

Важное для хроматографии различие между малыми молекулами и биологическими макромолекулами обусловлено полиэлектролитным характером последних. Наличие нескольких точек связывания макромолекулы с сорбентом в случае обычной адсорбции или в ионообменной системе приводит к ряду специфических особенностей взаимодействия вещества с сорбентом. Во-первых, начинается сказываться стерическое соответствие между ними, например близость средних расстояний между взаимодействующими (сорбционными, ионогенными) группами на поверхности макромолекулы и на сорбенте, что диктует определенную конформационную избирательность процесса. Во-вторых, переход от прочной, почти полной сорбции вещества в неподвижной фазе к его преимущественному нахождению в подвижной может быть очень резким. Этот переход выражен тем резче, чем больше среднее число точек закрепления («якорей»), связывающих макромолекулу с сорбентом. Постепенное увеличение силы элюента (например, концентрации вытесняющей соли) может длительное время оставаться без видимого эффекта, так как уменьшение среднего числа точек фиксации молекулы еще не освобождает ее. Затем, при достижении критического значения данного параметра элюции, происходит быстрое перераспределение вещества в пользу подвижной фазы.

Это означает, в частности, что фракционирование макромолекул путем изократической элюции в большинстве случаев имеет мало шансов на успех. Подавляющее большинство макромолекул при данном выборе элюента либо уже будет находиться в подвижной фазе, либо окажется слишком прочно связанным с неподвижной фазой. Непрерывная линейная градиентная элюция здесь удобнее, так как она для одного белка за другим создает ситуацию, отвечающую быстрой десорбции. Отметим попутно, что можно исходно уменьшить среднее число точек сорбции и тем самым улучшить условия разрешения, если уже при внесении вещества на колонку уравновесить ее жидкой средой, которая препятствует многопозиционной сорбции вещества в колонке, например соевым раствором умеренной концентрации. Однако подобрать такую концентрацию, которая была бы оптимальной для всех компонентов смеси макромолекул, удастся редко.

Сопоставляя непрерывную и ступенчатую градиентные элюции макромолекул, можно заключить, что первая из них, как правило,

дает лучшее и более полное разрешение всех компонентов фракционируемой смеси — ценой весьма заметного растягивания задних фронтов хроматографических пиков (из-за неравновесного распределения между фазами). Ступенчатая элюция, наоборот, позволяет получить острые пики с очень хорошим выходом, но нередко за счет качества разрешения близких по своим свойствам компонентов, особенно если «высота» ступеней велика и их расположение не слишком удачно. Опасность получения ложных пиков в этом методе уже отмечалась выше.

Еще одна особенность хроматографии макромолекул связана с проблемой доступности всего объема неподвижной фазы внутри гранул. Ограничение такой доступности вследствие статистического разброса размеров пор пространственной сетки гранул используется для фракционирования макромолекул по размерам в методе гель-фильтрации, однако в других вариантах хроматографии ограничение доступности не только уменьшает емкость системы, но и существенно затрудняет установление равновесия в неподвижной фазе. В этом плане обычные микропористые обменники на основе силикагеля, стекла и полистирола существенно уступают крупнопористым матрицам из целлюлозы и даже декстрана. К сожалению, матрицы двух последних типов легко деформируются и потому непригодны для хроматографии при повышенном давлении. Правда, в последние годы путем специальной обработки удалось получить крупнопористые, пригодные для фракционирования белков матрицы и из перечисленных выше жестких материалов; их марки и характеристики приведены ниже.

Этими более или менее общими соображениями и выводами из проведенного теоретического анализа можно пока ограничиться, имея в виду, что при последующем рассмотрении различных методов хроматографии будет возможность опереться на некоторые из развитых здесь положений.

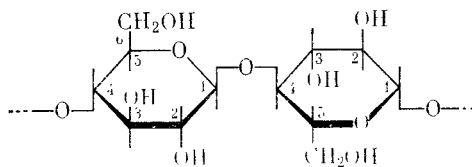
МАТЕРИАЛЫ МАТРИЦ СОРБЕНТОВ И ОБМЕННИКОВ

Матрицей называют твердую основу неподвижной хроматографической фазы. Она имеет вид сплошных или пористых гранул; последние часто представляют собой пространственную сетку линейных полимеров. Для придания материалу матрицы необходимых для хроматографии свойств его модифицируют. Модификация может представлять собой химическое присоединение («присадку») попоженных групп, гидрофобных молекул, биологически активных веществ или фиксацию путем адсорбции тонкого слоя растворителя. Хотя особенности хроматографического процесса определяются в основном характером модификации, физико-химические параметры матрицы могут существенно влиять на свойства неподвижной фазы. К таким параметрам относятся следующие: размеры и форма гранул и их пор; диапазон разброса этих размеров; механическая прочность материала матрицы; характер его смачивания и набухания в элюенте; химическая стойкость и инертность в условиях хроматографической элюции; реакционная способность, обеспечивающая возможность химической модификации матрицы.

Одни и те же матрицы, по-разному модифицированные, могут образовывать неподвижную фазу для разных хроматографических методов, поэтому во избежание повторений в данной главе мы познакомимся с физико-химическими свойствами всех применяемых в настоящее время матриц, а их модификации (а также свойства и номенклатуру получаемых путем этих модификаций сорбентов) рассмотрим в последующих главах, посвященных различным методам хроматографии. Прежде чем перейти к анализу свойств различных матриц, укажем общие для них способы обозначения диапазона линейных размеров гранул (а для сфер — их диаметров). Этот диапазон указывают либо непосредственно в микронах, либо в виде интервала чисел «МЕШ» («mesh»). Число МЕШ соответствует числу нитей на дюйм в сетке с квадратными ячейками, через которую просеиваются гранулы. С учетом толщины самих нитей это означает, что через сетку в 100 МЕШ пройдут все гранулы, максимальный размер которых меньше 160 мкм, через сетку в 200 МЕШ — меньше 80, 400 МЕШ — меньше 40. Таким образом, диапазон размеров гранул 40—80 мкм соответствует 200—400 МЕШ. В него попадут гранулы, которые просеиваются через сетку в 200 МЕШ, но не проходят через ячейки сетки в 400 МЕШ. Для мелких гранул, размер которых менее 40 мкм, принято обозначение —400 МЕШ.

ЦЕЛЛЮЛОЗА

Это — полисахарид, линейный полимер, образованный остатками глюкозы, связанными β -1,4-глюкозидной связью. Каждое звено глюкозы несет три свободные гидроксильные группы. Таким образом, нить полимера представляет собой полиатомный спирт. Для



Структура целлюлозы

целлюлозы характерны высокая степень гидрофильности и склонность к образованию многочисленных водородных связей между нитями полимеров. Наличие множества гидроксильных групп позволяет легко модифицировать целлюлозу путем химического присоединения разнообразных заместителей, например ионогенных групп или биологически активных молекул. Вместе с тем сама целлюлоза химически достаточно инертна и не вступает в реакции с белками, нуклеиновыми кислотами и их компонентами. Этого, к сожалению, нельзя сказать о возможности сорбции биологических молекул на целлюлозе, на чем придется подробнее остановиться ниже. Целлюлоза неустойчива к воздействию сильных кислот, щелочей и окислителей. Она выдерживает контакт с минеральными кислотами и щелочами, концентрация которых не превышает 0,5 н., и то не более 2 ч при комнатной температуре. Рабочий интервал pH для обменников на основе обычной целлюлозы составляет 3—10. Целлюлоза охотно атакуется микроорганизмами даже на холоду, поэтому ее водные суспензии хранят в присутствии антисептиков (например, 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Водородные связи между линейными цепями целлюлозы на отдельных участках могут образовывать псевдокристаллические структуры, которые чередуются с более рыхлыми, аморфными областями — «порами». Так формируются макроскопические нити целлюлозы, легко набухающие в поперечном направлении. «Кристаллические» участки малодоступны для присоединения модифицирующих заместителей, которые из-за этого располагаются главным образом на поверхности нитей и в порах (рис. 15). В целом получается микрогетерогенная структура, характер которой зависит от исходного материала и технологии обработки целлюлозы. По этой причине свойства целлюлозы, в том числе хроматографические, могут весьма заметно варьировать не только у различных фирм, но и от партии к партии. Следует постоянно иметь в виду это обстоятельство и отрабатывать режим хроматографии заново для каждой новой партии сорбента на основе целлюлозы. Весьма существенно также представлять себе влияние сушки на свойства целлюлозы. При удалении воды образуется множество дополнительных водородных связей на аморфных участках матрицы, так что объем пор резко уменьшается. Далеко не все эти связи разрываются при простом замачивании целлюлозы в воде, поэтому необходима специальная обработка («cycling») как сухой продажной целлюлозы, так и уже исполь-

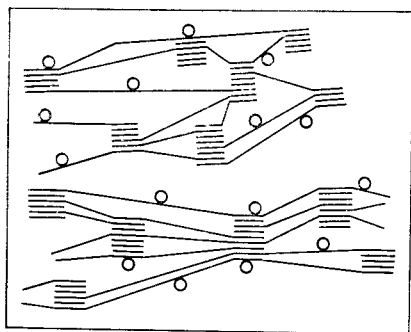


Рис. 15. Схема структуры целлюлозной матрицы (кружками обозначены модифицирующие заместители)

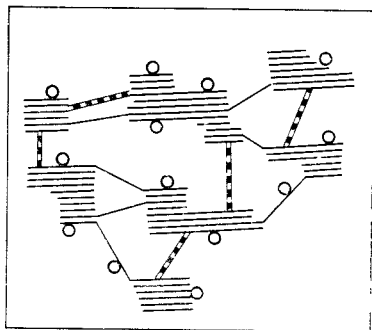


Рис. 16. Схема структуры микрогранулированной целлюлозы («лесенками» обозначены химические сшивки между нитями полисахарида)

зованного сорбента после каждого его высыхания. Такая обработка заключается в суспендировании целлюлозы в 15 объемах 0,5 н. NaOH на 30 мин и последующей промывке водой на фильтре до pH 8. Смысл этой обработки — в диссоциации OH-групп, после чего нити «растаскиваются» взаимодействием отрицательных зарядов, а дополимерные водородные связи рвутся. Ионообменники на основе целлюлозы обрабатывают аналогично, для чего их суспендируют в 0,5 н. растворе кислоты или щелочи в зависимости от типа ионообменника (подробные рекомендации даны в гл. 7). При набухании 1 г сухой целлюлозы связывает около 2,5 г воды.

Микрогранулированная целлюлоза. Для повышения жесткости проводят частичный кислотный гидролиз целлюлозы, разрушающий аморфные участки матрицы. На их место для сохранения пористости между «кристаллическими» участками вводят химические сшивки (рис. 16); одновременно увеличивается степень «кристалличности», а поры становятся просторнее. Такую целлюлозу выпускают многие фирмы под названием «микрогранулированная целлюлоза». Помимо повышенной жесткости, она более однородна, что обеспечивает более высокую по сравнению с обычной (волокнуистой) целлюлозой разрешающую способность. Микрогранулированная целлюлоза представляет собой уже не длинные нити, а гранулы продолговатой формы с соотношением линейных размеров порядка 5 : 1 и диаметром эквивалентной сферы (см. гл. 4) около 50 мкм, а для тонкослойной хроматографии — около 8 мкм. Микрогранулированная целлюлоза хорошо упаковывается в колонку, но отличается большим сопротивлением току элюента («хуже течет»), чем волокнистая целлюлоза.

Волокнистая целлюлоза. Продажные препараты с таким названием сохраняют описанную выше структуру относительно длинных нитей с аморфными участками, хотя и они проходят специальную обработку для увеличения степени кристалличности и освобождения

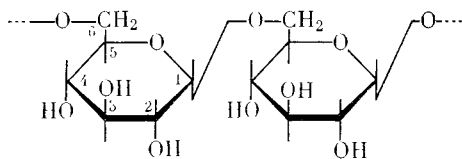
от мелких «обрывков» нитей. Колонки, заполненные волокнистой целлюлозой, заметно лучше «текут», но не обеспечивают тонкого фракционирования. Их целесообразно использовать на ранних стадиях очистки биополимеров.

В нашей области интересов целлюлозные матрицы в чистом виде используются для нормальнофазовой распределительной хроматографии (главным образом, при ТСХ), а модифицированные — в ионообменной и аффинной хроматографии.

Некоторые справочные данные. Немодифицированные порошкообразные целлюлозы для ТСХ и синтеза аффинных обменников в лабораторных условиях выпускает целый ряд фирм. Фирма «Whatman» (Англия) предлагает микрогранулированную целлюлозу для ТСХ марки СС 41. Аналогичная целлюлоза для колоночной хроматографии выпускается под маркой СС 31, а волокнистая — под маркой СФ 11. Перечень весьма популярных ионообменников на основе целлюлозы той же фирмы приведен в гл. 7. Хорошо известны также различные марки хроматографической бумаги, выпускаемые этой фирмой, однако мы их не приводим, поскольку в настоящее время хроматография на бумаге практически уступила свое место ТСХ на пластинках. Фирма «Macherey-Nagel» (ФРГ) для целей ТСХ предлагает микрокристаллическую целлюлозу «AVICEL for TLC» и волокнистую — MN300 (MN300 UV₂₅₁ — с флуоресцентным индикатором; MN300HP — промытую кислотой). Для колоночной хроматографии та же фирма поставяет микрокристаллическую целлюлозу «AVICEL» и волокнистую MN2100. Фирма «Bio-Rad» (США) предлагает две марки волокнистой целлюлозы для колоночной хроматографии — «Cellex N-1» и «Cellex 410» (последняя лучше очищена). Фирма «Sigma» (США) выпускает три типа волокнистой целлюлозы марки «Sigmacell» (100, 50 и 20) для ТСХ; цифры указывают средний размер зерен в микронах.

ГЕЛИ НА ОСНОВЕ ДЕКСТРАНА (СЕФАДЕКСЫ)

Декстран также представляет собой полисахарид — в основном линейный полимер на основе глюкозы, где звенья связаны α -1,6-



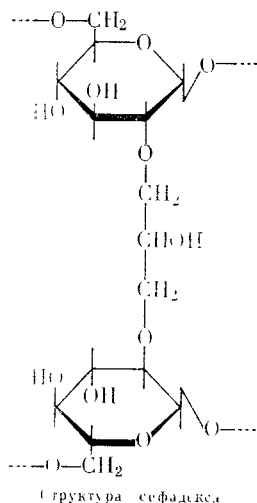
Структура декстрана

глюкозидной связью. Это тоже полиатомный спирт с высокой степенью гидрофильности, предоставляющий столь же широкие, как и целлюлоза, возможности для модификации и также химически инертный. Устойчивость

к действию кислот у декстрана еще меньше, чем у целлюлозы. Его не следует обрабатывать более крепким раствором, чем 0,1 н. HCl (в течение 2 ч). К щелочи гели на основе декстрана более устойчивы: они сохраняют свои свойства в 0,25 н NaOH до

2 мес даже при температуре 60°. Рабочий диапазон pH составляет 2—12. Существенное отличие от целлюлозы состоит в том, что нити декстрана не образуют агрегатов, так как они не вполне линейны — имеются достаточно многочисленные ветвления (по связям 1,2-, 1,3- и 1,4-).

В гелях для хроматографии («сефадексах») нити декстрана химически сшиты эпихлоргидрином. Однако сшивка не очень жесткая:



сефадексы относительно мягки и легко сжимаются, а в водных растворах сильно набухают. Все эти качества выражены тем сильнее, чем меньше процентное содержание эпихлоргидрина. Изменяя долю сшивки, можно регулировать средний размер пор, образуемых пространственной сеткой сшитого геля. Ввиду статистического распределения сшивок по объему геля разброс размеров пор невелик, и сефадексы заметно более гомогенны, а свойства их лучше воспроизводимы, чем у целлюлозы. Они «не боятся» высушивания и при замачивании не требуют никакой специальной обработки. Сефадексы можно автоклавировать как в сухом, так и во влажном виде — в нейтральной среде при 120° в течение 30 мин. Суспензию сефадекса (набитую колонку) следует хранить с антисептиком, так как он, по-

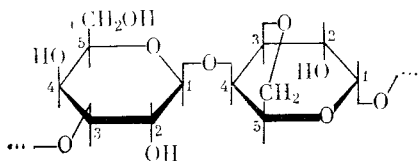
добно целлюлозе, легко атакуется микроорганизмами. Сефадексам присуща некоторая адсорбционная способность по отношению к ароматическим и гетероциклическим молекулам, которую даже удается использовать для фракционирования нуклеиновых оснований, ароматических аминокислот и пептидов. Кроме того, продажные сефадексы содержат в своей структуре небольшое количество карбоксильных групп, что придает им некоторое сродство к катионам. При хроматографии его легко подавить введением в элюент соли в концентрации около 0,02 M.

Мягкость сефадексов (особенно слабосшитых) накладывает ограничения на допустимые значения скоростей хроматографической элюции, которые подробно рассмотрены ниже. По этой же причине определенные сложности возникают при использовании ионообменников на основе сефадексов: за счет сил электростатического отталкивания своих ионогенных групп они склонны деформироваться при изменении ионной силы элюента. Все это привело к разработке в последние годы ряда более жестких матриц, начинающих вытеснять сефадексы из традиционных областей их применения — гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. С ними мы познакомимся далее в этой главе, однако ввиду все еще очень широкой распространенности (и меньшей стоимости) сефадексов в дальнейшем изложении будет уделено достаточно внимания. Практически монопольным

производителем сефадексов является шведская фирма «Pharmacia», хотя аналогичные матрицы на основе декстрана выпускает и венгерская фирма «Reanal» под торговым названием «молселект». Технические характеристики и номенклатуру сефадексов мы приведем в гл. 4 и 7.

АГАРОЗА

Свойства агарозы были рассмотрены в первой книге этой серии, посвященной электрофорезу [Остерман, 1981]. Однако ввиду центральной роли, которую играют агарозные матрицы в некоторых хроматографических методах (гель-фильтрация, аффинная хроматография), имеет смысл привести здесь некоторые данные еще раз. Как и



Структура агарозы

две предыдущие матрицы, агароза является полисахаридом, т. е. полиатомным спиртом. Ее элементарным звеном служит дисахарид агаробиоза, в состав которого входит необычный сахар — 3,6-ангидро-*L*-галактоза. Из-за

этого агароза более устойчива к действию микроорганизмов, чем целлюлоза и сефадексы, однако ее тоже следует хранить в присутствии антисептика.

Агароза очень гидрофильна, а ее полимерные нити еще в большей степени, чем нити целлюлозы, склонны к образованию водородных связей. Благодаря этому горячий 2—6%-ный раствор агарозы застывает в виде жесткого и очень крупнопористого геля. Нити полимера собираются в пучки и образуют жесткий пространственный каркас с пустотами внутри (рис. 17). При температуре около 100° гель агарозы плавится, поэтому его нельзя автоклавировать; в случае необходимости гель приходится стерилизовать раствором диэтилпиروкарбоната. Модификация агарозы может происходить также по гидроксильным группам, плотность расположения которых, однако, значительно ниже, чем у сефадексов, поскольку на звено дисахаридов приходится четыре вместо шести. Положение усугубляется тем, что внутри плотно упакованных лучков нитей гидроксильные группы недоступны для модификации. В условиях хроматографии агароза химически неактивна, но уязвима для действия кислот, щелочей и окислителей. Рабочий диапазон pH при использовании матриц из обычной агарозы лежит в пределах 4—9. Агароза выдерживает непродолжительный контакт с 8 М мочевиной и 6 М гуанидинхлоридом, которые все же постепенно ее разрушают.

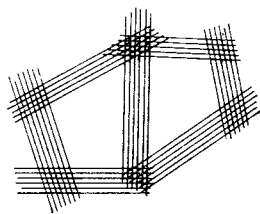


Рис. 17.
Структура агарозы

Поскольку агароза для хроматографии представляет собой водный гель, о набухании ее говорить не приходится. Но следует помнить о том, что агарозу нельзя сушить ввиду необратимой деструкции геля. Агароза для хроматографии поставляется в виде суспендированных в воде сферических гранул диаметром 60—200 мкм, которые в таком виде и следует хранить. При кратковременном обсыхании колонки, заполненной агарозой, пока гранулы не начали терять находящуюся в них жидкость, хроматографические характеристики сорбента еще могут быть восстановлены. Если же подсыхание гранул началось, то гель приходится выбрасывать (разумеется, его можно расплавить и использовать, например, для электрофореза, но гранулированная структура будет уже утрачена). Размер пор (пустот) в гранулах зависит от процентного содержания агарозы в геле (2, 4 или 6%). Связанные с агарозой остатки сульфокислоты (до 0,5% по массе) могут сорбировать щелочные белки. Эта сорбция подавляется в присутствии 0,02 М NaCl или другой соли. Гранулированную агарозу для гель-фильтрации и синтеза аффинных сорбентов выпускают следующие фирмы: «Pharmacia» — под торговым названием «Sepharose», «Bio-Rad» — под названием «Bio-Gel A», «LKB» (Швеция) и «IBF» (Франция) — под названием «Ultrogel A». Подробные сведения об этих матрицах, а также о готовых аффинных сорбентах на их основе приведены в гл. 4 и 8.

Для повышения химической и термической стойкости матриц фирма «Pharmacia» разработала вариант гелей агарозы, в которых нити полимера дополнительно химически «сшиты» обработкой 2,3-дибромпропанолом в сильно щелочной среде. Матрицы на основе такой «сшитой» агарозы носят общее наименование «Sephарose CL». Их можно использовать в значительно более широком диапазоне рН (3—14) и даже автоклавировать при температуре 120°. Они обладают еще большей жесткостью, выдерживают длительный контакт с 8 М мочевиной и 6 М гуанидинхлоридом, а также со многими органическими растворителями (этанолом, ацетоном, хлороформом, пиридином, ацетонитрилом, дихлорэтаном, ДМФ, ДМСО и др.). Последнее обстоятельство имеет важное значение для осуществления реакций модификации.

ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ (ПААГ)

Свойства ПААГ были также подробно рассмотрены при анализе метода электрофореза. Нити линейного полимера акриламида, сшитые N,N'-метиленисакриламидом, образуют относительно жесткую и химически инертную пространственную сетку геля, хорошо удерживающую воду. Пористость и жесткость геля определяется процентным содержанием в нем полимера. Гранулированные матрицы ПААГ используются только для гель-фильтрации. Рабочий диапазон рН — 3—8. Гель можно автоклавировать; он выдерживает контакт с разбавленными органическими кислотами, 8 М мочевиной, 6 М гуанидинхлоридом, детергентами. В отличие от агарозы ПААГ не

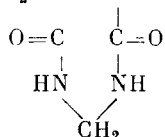
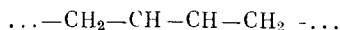
бойтся» высушивания. Матрицы поставляются в виде сухих сферических гранул нескольких диапазонов диаметров в интервале от 40 до 300 мкм. При замачивании они сильно набухают и могут связывать, в зависимости от содержания ПААГ, от 3 до 30 мл воды на 1 г сухих гранул.

Полиакриламидные матрицы выпускают фирмы «Bio-Rad» (под общим названием «Bio-Gel P») и «Reanal» (под названием «Акрилекс»). Более подробные сведения об этих матрицах приведены в гл. 4. На основе полиакриловой кислоты выпускают также ионообменники — «Trisacryl» (фирма «I.K.B.») и «Bio-Rex 70» (фирма «Bio-Rad»).

В целях объединения достоинств описанных выше материалов было создано два новых типа комбинированных матриц — «Sephacryl» и «Ultrogel AcA».

СЕФАКРИЛЫ

Торговое название «Sephacryl» получила разработанная фирмой «Pharmacia» матрица для гель-фильтрации на основе декстрана и N,N'-метиленбисакриламида. В ней удачно сочетаются качества сефадексов и ПААГ — нити декстрана и полимерные нити метиленбисакриламида (он способен полимеризоваться в нити подобно акриlamиду — см. рис. 22) химически связаны друг с другом.



Структура полиэтиленбисакриламида

Получается очень жесткий гель, пористость которого легко контролировать. Он гидрофилен, химически инертен, выдерживает контакт с 8 М мочевиной, 6 М гуанидинхлоридом, детергентами и органическими растворителями; его можно автоклавировать при 120°. Рабочий диапазон pH — 2—11. Благодаря своей жесткости сефакрил может быть использован при значительно больших скоростях элюции, чем сефадекс с такой же пористостью. Адсорбция здесь несколько более заметна, чем у сефадексов, особенно при кислых значениях pH (ее подавляет 0,05 М NaCl). Сефакрил поставляется в виде суспензии набухших гранул с размерами 40—105 мкм. Подробные данные об этих матрицах изложены в гл. 4.

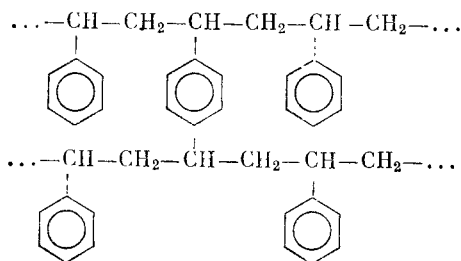
УЛЬТРОГЕЛИ ТИПА AcA

«Ultrogel AcA» — еще один вариант жесткой матрицы, обеспечивающей широкие возможности выбора размера пор. Здесь контролируемая пористость ПААГ сочетается с жесткостью агарозы — сетка ПААГ полимеризуется внутри жесткого каркаса агарозы. Химичес-

кой связи между ними нет, но агароза придает жесткость сферическим гранулам ультрогеля, в то время как их пористость определяет ПААГ. По химической и термической стойкости эта матрица сходна с агарозой; диапазон диаметров гранул — 60—140 мкм. Матрицы типа «Ultrogel AcA» с различным содержанием агарозы и ПААГ (см. гл. 4) в виде водных суспензий поставляют фирмы «LKB» и «IBF». Эти матрицы нашли применение не только для гель-фильтрации, но и для синтеза аффинных сорбентов на их основе.

ПОЛИСТИРОЛЬНЫЕ СМОЛЫ

Нити линейного полимера полистирола, химически «сшитые» молекулами дивинилбензола в жесткую пространственную сетку, выпускаются в виде сухих сферических гранул под торговым названием «смол» («resins»).



Структура полистирола

Содержание дивинилбензола варьирует от 2 до 12 %, определяя средние размеры пор сетки. Эти размеры обычно малы, так что внутренний объем гранул полистирола доступен только для низкомолекулярных соединений (нуклеотидов, аминокислот, коротких пептидов и др.). Впрочем, имеются и «макроретикулярные» типы смол на основе полистирола; при их изготовлении микрогранулы смолы спекаются в гранулы обычных размеров (30—300 мкм). Внутренний объем таких гранул, представленный свободным пространством, остающимся между микрогранулами, доступен для биологических макромолекул.

Немодифицированные полистирольные смолы гидрофобны. Модификация осуществляется присоединением ионогенных групп по остаткам бензола в пара-положении. Это придает смоле в целом гидрофильность, хотя возможность и склонность к гидрофобным взаимодействиям с фракционируемым материалом сохраняется. Для хроматографии компонентов белков и нуклеиновых кислот в водных элюентах смолы на основе полистирола применяются только в качестве матриц ионообменников. Благодаря частоте расположения в пространстве остатков бензола эти матрицы отличаются высоким содержанием ионогенных групп. Химически они очень устойчивы (можно промывать 4 н. HCl и 2 н. NaOH) и выдерживают нагревание до 120°. При замачивании гранулы набухают, связывая (в зависимости от

пористости) от 1 до 3 мл воды на 1 г сухой смолы. Макроретикулярные ионообменники на основе полистирола можно, вообще говоря, использовать для хроматографии белков, но при этом следует опасаться денатурации за счет гидрофобных взаимодействий белковых глобул с материалом матрицы. Для липофильных белков мембран такое взаимодействие, по-видимому, опасности не представляет.

Наиболее популярные ионообменники на основе полистирола выпускаются под торговыми названиями «Dowex» (фирма «Dow Chemical Co») и «Amberlyte» (фирма «Rohm and Haas») и перепродаются большинством фирм, торгующих биохимическими реактивами. Хорошо промытые и отсеянные обменники типа «Dowex» для аналитических целей поставляет фирма «Bio-Rad» под наименованием «Bio-Rad AG». Повышенные требования, предъявляемые к ионообменникам для современных аминокислотных анализаторов, привели к разработке специальных полистирольных смол («Aminex», «Dugum» и др.) с малым разбросом размеров около номинальных значений порядка 10—20 мкм. Для высокоэффективной хроматографии при высоких давлениях (ЖХВД) производят так называемые «пленочные» ионообменники, у которых пленка полистирольной смолы толщиной около 1 мкм фиксирована на поверхности стеклянных шариков диаметром 4 мкм («Whatman-Pellionex»).

Подробная номенклатура ионообменников на основе полистирола приведена в гл. 7.

ПОЛИАМИДНЫЕ СМОЛЫ

Название «полиамиды» объединяет группу различных гетероцепных полимеров, содержащих повторяющуюся амидную группу $-CO-NH-$. Они могут быть получены путем гомополиконденсации аминокислот (например, ϵ -аминокапроновой кислоты), иногда с образованием лактамов (найлон-6, капрон). Амидные группы обеспечивают в целом достаточную степень гидрофильности полимера, но и гидрофобные свойства могут быть выражены, причем тем заметнее, чем длиннее углеводородная цепочка исходной аминокислоты. Полиамидные смолы используют главным образом для тонкослойной хроматографии. Они выпускаются в виде порошков или готовых пластинок для ТСХ с полиамидным покрытием. Номенклатура этих изделий представлена в гл. 9. Для целей ЖХВД фирма «Whatman» поставляет готовые хроматографические колонки с пленочным адсорбентом «Pellamidon», у которого на стеклянных бусах фиксирована пленка нейлона-6.

КИЗЕЛЬГУР (ЦЕЛИТ, ДИАТОМОВАЯ ЗЕМЛЯ)

Под этими названиями фигурирует большое число различных крупнопористых материалов, представляющих собой окаменевшие панцири древних диатомовых водорослей. Кизельгуры примерно на

90% состоит из SiO_2 , а также содержат 4% Al_2O_3 и менее значительные примеси окислов других металлов, в том числе около 1,4% Fe_2O_3 . Окислы железа удаляют обработкой 10%-ной HCl , материал сушат при 110° , перемалывают, отсеивают и поставляют в виде жестких и очень пористых гранул. Они гидрофильны, химически инертны и обладают высокой адсорбционной способностью. Из множества марок сорбентов на основе кизельгура для биохимических целей наиболее пригодны «Celite 545» и «Hyflo-Super-Cel». Кизельгуры широко используют в качестве основы матриц для распределительной хроматографии в обращенных фазах. Для этой цели поверхность гранул и пор силиконируют обработкой парами диметилдихлорсиланов и промывают метанолом. Из особо хорошо очищенных кизельгуров типа «Chromosorb», выпускаемых главным образом в качестве носителей для газовой хроматографии, для целей жидкостной ХОФ лучше всего подходит силиконированный «Chromosorb W» (фирма «Johns-Manville»). На 1 г этого сорбента можно иммобилизовать до 0,9 мл неполярной жидкости, служащей неподвижной фазой для ХОФ.

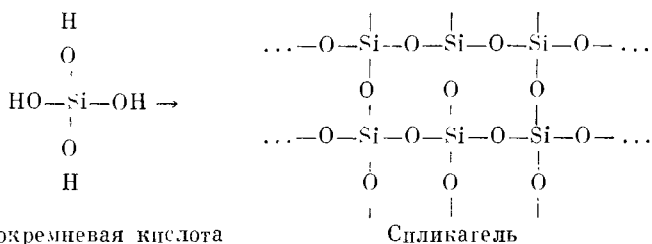
СИЛИКАГЕЛЬ

Матрицы и сорбенты на основе силикагеля получили в последние годы очень широкое распространение, особенно для ЖХВД. Бурное развитие ЖХВД, особенно в качестве экспресс-метода технологического контроля в пищевой, фармакологической и многих областях химической промышленности, а также в клинике, привело к появлению большого числа специализированной аппаратуры и еще большего количества торговых наименований силикагелей для хроматографии. Ниже мы приведем их далеко не полный список, который позволит читателю ориентироваться в этом многообразии. Но сначала следует описать общие свойства силикагельных матриц и вариантов их модификации, поскольку, по-видимому, в ближайшие годы область применения силикагелей расширится за пределы сферы анализа смесей относительно низкомолекулярных соединений на хроматографию белков, нуклеиновых кислот и других биополимеров при умеренных давлениях.

Силикагель («silica gel», «silica») — это аморфное вещество с общей химической формулой $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Закислением раствора силиката натрия получают золь ортокремневой кислоты ($\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), затем его «состаривают», промывают и сушат. В процессе «старения» золя идет его поликонденсация в микрочастицы, которые затем образуют конгломераты, пронизанные капиллярами (порами) со средним линейным размером в пределах 3—30 нм. Удельная поверхность силикагелей может достигать очень больших значений — порядка $600 \text{ м}^2/\text{г}$. В зависимости от технологии приготовления можно получить различные размеры микрочастиц и пор между ними. От нее весьма существенно зависит и разброс этих размеров, а также поверхностные свойства материала, что весьма существенно влияет на хроматографические характеристики матриц. Поэтому не удивитель-

но, что силикагели различных марок, имеющие, согласно фирменным данным, как будто одинаковые параметры, по-разному проявляют себя в хроматографическом процессе.

Процесс поликонденсации схематически можно представить следующим образом:

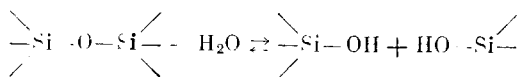


Ясно, что эта плоская схема очень далека от действительности. Атомы кислорода находятся в вершинах тетраэдра, что обуславливает более сложную пространственную структуру микрочастиц. Однако для нас сейчас представляют интерес две особенности этой схемы, очевидно, сохраняющиеся и при построении пространственной системы. Во-первых, атомы кремния жестко связаны между собой кислородными мостиками; во-вторых, на поверхности микрочастиц, а следовательно, в порах и на поверхности гранул силикагеля должны в большом количестве находиться силанольные группы — связанные с кремнием гидроксилы. В результате последнего обстоятельства силикагель очень гидрофилен: силанольные группы охотно образуют водородные связи с молекулами воды. Общеизвестно, что силикагель широко используется в качестве осушителя; по этой же причине он является прекрасным сорбентом.

Увлажненный силикагель регенерируют и активируют при температуре 200—400°. Результаты процесса зависят от выбора температуры в этом диапазоне. Прогревание при 150° ведет к постепенной утрате силикагелем физически связанной (сорбированной) воды, и сорбционная способность его увеличивается. В интервале 150—250° она остается практически неизменной. Нагревание в интервале 250—400° приводит к отнятию химически связанной воды от наиболее реактивных силанольных групп. Сорбционная способность снижается, но становится более однородной по всей поверхности силикагеля. Выше 400° потеря воды связана с образованием силоксановых мостиков между соседними силанолами, и сорбционная способность падает необратимо. Для получения стандартной адсорбционной способности силикагель после полного высушивания частично дезактивируют, добавляя дозированное количество воды (20—30 мл на 100 м² общей поверхности). Такой силикагель, сохраняя гидрофильность и высокую адсорбционную способность, практически не связывает воду из атмосферы. Покрытые им пластинки для ТСХ и сорбенты для адсорбционной хроматографии можно длительно хранить, но, разумеется, не в слишком влажном воздухе.

Немодифицированный силикагель достаточно инертен, хотя следует помнить, что силанольные группы делают его поверхность слег-

ка кислой. Рабочий диапазон pH для таких силикагелей лежит в нейтральной и кислой областях (pH 3—8). В щелочной среде силикагель приобретает химическую активность, но вместе с тем постепенно разрушается (растворяется) водой:



До сих пор в большинстве случаев силикагель для ЖХВД выпускается в виде гранул неправильной формы. Некоторые фирмы освоили производство сферических гранул. Один из вариантов технологии, пригодной для этой цели, состоит в получении органических полимеров сферической формы, в которые оказываются погружены коллоидные частицы силикагеля. При высокой температуре полимер выжигают, получая таким образом пористые сферические гранулы, образованные спекшимися микрочастицами силикагеля.

Химическая модификация силикагеля производится по тем же силанольным группам. Его пористая структура при этом сохраняется. Модификация глицерилпропилсиланом лишает силикагель адсорбционной способности, сохраняя гидрофильность; такая матрица удобна для гель-фильтрации. Модификация алифатическими цепями различной длины (диметилсилан, октилсилан, октадецилсилан) или присадка фенильного остатка дают возможность получить матрицы для ХОФ (в реакцию модификации иногда вводят ди- или трихлорсилановые производные радикалов). Введение полярных групп, например $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, позволяет получить обменники для нормальнофазовой распределительной хроматографии (НРХ). Присадкой ионогенных групп получают ионообменники обоих типов (как правило, сильные). Наконец, как уже упоминалось, немодифицированный силикагель используют для адсорбционной хроматографии. Таким образом, матрицы на основе силикагеля служат для ЖХВД почти во всем диапазоне хроматографических методов, за исключением лишь аффинной хроматографии. Остается добавить, что, кроме пористых гранул, модифицированные силикагели применяют и для создания матриц пленочного типа, когда стеклянные шарики диаметром 30—40 мкм покрывают пористой пленкой силикагеля толщиной около 1 мкм. Ввиду краткости пути диффузии вещества пленочные сорбенты позволяют проводить хроматографический процесс с очень большой скоростью, хотя их емкость, естественно, невелика.

Теперь рассмотрим фирменные обозначения сорбентов на основе силикагеля. В связи с изложенным удобно начать с перечня условных обозначений, указывающих характер модификации силикагеля (табл. 4). Они ставятся всегда после фирменного названия самого силикагеля, например «*μ* Bondapak Phenyl» или «*U*ltasphere ODS». Разные фирмы используют различные условные обозначения. В дополнение к указанным в таблице следует привести обозначение «IP» — оно расшифровывается как «ион-парная» (хроматография). Так называют один из вариантов обратнoфазовой хроматографии,

Таблица 1
Обозначения модификаций силикагелей для ЖХВД

Метод хроматографии	Обозначение модификации	Модифицирующий радикал; характер обменника
Гель-фильтрация	ОН; DIOL	Глицерилпропилсилан
ХОФ	RP-2	Диметилсилан
«	RP-8; C ₈ ; OCTYL	Октилсилан
«	RP-18; C ₁₈ ; ODS	Октадецилсилан
«	C ₆ H ₅ ; Phenyl	Фенил
Нормальнофазовая	CN; NO ₂ ; NH ₂ ; N(CH ₃) ₂	Алкилсиланы соответствующих групп
распределительная	RAC≡CN — NH ₂	Анионообменники
Ионообменная	AX; SAX; SB; AN	Катионообменники
«	CX; SCX; SA; CAT; KAT	Нет модификации
Адсорбционная	Si 100, 300, 500, 1000 и 4000	(цифра — диаметр пор в ангстремах)

с которым мы познакомимся в гл. 5. Модификация состоит в присоединении октадецилсилана (C₁₈) и последующей блокировке всех оставшихся свободными силанолов обработкой триметилхлорсиланом.

Чтобы помочь читателю ориентироваться в многообразии торговых наименований силикагельных матриц для ЖХВД, в табл. 2 в алфавитном порядке приведен список наименований матриц, наиболее часто встречающихся в литературе, с указанием основных параметров и фирм-производителей. Подробные сведения об этих матрицах можно почерпнуть в фирменных каталогах.

Сопоставляя фирменные наименования с условными обозначениями, нетрудно составить представление о характере матриц, использованных в описываемых экспериментах. Нередко в торговое название сорбента фирмы включают еще и цифры: 5, 10 или 60, 100, 300 и т. д. Они указывают размер гранул в микрометрах или средний размер пор в ангстремах, а что именно — легко понять по значению этих цифр.

Достоинства пористого силикагеля побудили фирму «Serva» включить в ассортимент своей продукции, наряду с матрицами для ЖХВД («Si100-Polyol»), и матрицы на основе силикагеля для обычной хроматографии с диаметрами сферических гранул в диапазоне 40—100 и 100—200 мкм и средними диаметрами пор 75, 150, 300, 500, 1200 и 3000 Å. Немодифицированные матрицы получили фирменное обозначение «Daltosil», а матрицы с гидрофильным полиольным покрытием для гель-фильтрации («Daltosil Polyol») обозначаются «SP». Кроме того, на основе матрицы SP-500 (диаметр пор 500 Å) выпускается целый ряд сорбентов для ионообменной, гидрофобной и аффинной хроматографии, а также для иммобилизации ферментов: DEAE-

Таблица 2

Торговые наименования и параметры силикагельных матриц для ЖХВД

Наименование сорбента	Фирма	Форма гранул	Линейный размер, мкм	Размер пор, А
Aquapor	Brownlee Labs	C	10	100; 300; 500; 1000
μ Bondagel	Waters	H	10	125; 500; 1000
μ Bondapak	«	H	10	100
Bondapak Corasil*	«	C	10	—
Corasil*	«	C	10	—
Lichrorep	Merck	H	5—20	60
Lichroorb	«	H	5; 7; 10	60; 100
Lichrospher	«	C	5; 7; 20	100; 300; 500; 1000
Micropak	Varian	C	5; 10	60
Nucleosil	Macherey-Nagel	C	5; 7,5; 10; 30	50; 100
Partisil	Whatman	H	5; 10	50
Pellosil*	«	C	40	—
Perisorb*	Merck	C	30—40	60
Polygosil	Macherey-Nagel	H	5; 7,5; 10; 25—40	60
μ Porasil	Waters	H	10	100
Resolve	«	C	5	—
Si 100-Polyol	Serva	H	3; 5; 10	100
Силохром 3	CCCP	H	—	450—600
Spheri 5	Merck	C	5	60
Ultrasil	Beckman	H	10	—
Ultrasphere	Beckman	C	3; 5	—
Ultropack TSK	LKB	H	10; 13	—
Ultrapore	Beckman	C	5	300
Vydac 1P*	John-Manville	C	10	300
Vydac SC*	«	C	30—44	60
Zipax	DuPont	C	30	—
Zorbax	«	C	6; 8	70—80

Примечания: Звездочкой отмечены матрицы пленочного типа; все остальные — пористые. Форма гранул: C — сферическая, H — неправильная.

SP500, Octadecyl-SP500, Isocyanat-SP-500, Glutaraldehyde-SP500, Biotinyl-SP500 и др. (всего 25 наименований — см. каталог фирмы за 1983/84 годы).

ОКИСЬ АЛЮМИНИЯ

Оксид алюминия для хроматографических целей («Alumina») получают в результате термического дегидрирования (при 400°) гидроокиси алюминия, осажденной в виде золя из раствора алюмината натрия. Ее подвергают старению, в процессе которого образуются прочные пористые конгломераты с удельной поверхностью до

200 м²/г. В зависимости от характера обработки эта поверхность в водной среде проявляет слегка кислые или щелочные свойства или же остается нейтральной. Препарат одной из кристаллических форм окиси алюминия под названием «Alumina C_γ» поставляется многими фирмами, выпускающими биохимические реактивы, в виде 5—20%-ной взвеси в воде. Он используется для адсорбционного фракционирования белков в объеме. Имеются в продаже также и сухие гранулы размером 5 мкм и выше с порами диаметром 60—150 Å («BDH», «Bio-Rad», «Sigma»).

Окись алюминия используют для ТСХ (часто в виде готовых пластинок) и для колоночной адсорбционной хроматографии. Для ЖХВД в щелочной среде (где спликатель непригоден) также используют матрицы на основе окиси алюминия — как сплошь пористые («Merck», «LiChrosorb», «Alox T»), так и пленочного типа («Whatman», «Pellumina»).

ПОРИСТОЕ СТЕКЛО

Путем специальной обработки щелочно-боросиликатного стекла и последующей экстракции растворимого материала удается получить стеклянные шарики с хорошо контролируемым размером пор — типа CPG-10 («controlled pore glass»). В качестве матриц для гель-фильтрации они привлекательны своей жесткостью, химической инертностью и жаростойкостью (при стерилизации). Однако следует иметь в виду, что их поверхность несет небольшой отрицательный заряд и может сорбировать, а иногда и денатурировать белки. Пористое стекло, ассортимент которого включает 11 размеров пор (от 75 до 3000 Å) и два, три или четыре диапазона диаметров шариков (от 20 до 400 МЕМ), поставляется фирмами «BDH» («Glass granules CPG-10»), «Serva» («CPG-10») и «Sigma» («PG»). Последние две фирмы производят также пористое стекло, у которого поверхностный заряд блокирован химической присадкой глицеридов: «CPG-10 Polyol» («Serva») и «GG» («Glyceryl glass»; «Sigma»).

ОКСНАПАТИТ

Как известно, фосфат кальция (брушит; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в воде нерастворим, но может давать суспензию очень мелких кристаллов (размером около 30 мкм), обладающих высокой адсорбционной способностью. Его получают, сливая растворы CaCl_2 и $\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_4$. При $\text{pH} > 7$ брушит постепенно превращается в окснапатит («hydroxapatite»), который можно представить брутто-формулой $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Это превращение можно ускорить обработкой щелочью. Подробная пропись приготовления окснапатита в лабораторных условиях дана в гл. 6. Из суспензии окснапатита можно отделить и высушить после промывки этанолом и ацетоном. Кристаллы окснапатита хрупки и легко крошатся, поэтому он требует осторожного обращения (в частности, нельзя допускать замерзания суспензии окси-

апатита). Заполненные им колонки плохо «текут», поэтому приходится работать с широкими и короткими колонками.

Оксиапатит используется в качестве сорбента для белков и нуклеиновых кислот. Основную роль в адсорбционном взаимодействии, по-видимому, играют ионы Ca^{2+} , находящиеся на поверхности кристаллов. 1 г оксиапатита может сорбировать около 10 мг белка или 1 мг ДНК. Десорбцию ведут фосфатным буфером, а в некоторых случаях — раствором соли (см. гл. 6). Оксиапатит поставляется в виде суспензии в разбавленном Na-фосфатном буфере или в виде порошка («Bio-Gel HT» и «Bio-Gel HTP» фирмы «Bio-Rad», а также аналогичные препараты фирм «Calbiochem» и «Sigma»). Фирма «BDH» недавно освоила выпуск оксиапатита в виде сферических гранул диаметром 75—185 мкм с порами диаметром от 5000 до 20 000 Å («Hydroxylapatite spheroidal»). По данным фирмы, он обладает повышенной прочностью и допускает увеличение скорости элюции до 100 мл/см²·ч.

Фирмы «LKB» (Швеция) и «IBF» (Франция) выпустили сорбент под названием «Ultrogel HA», в котором кристаллический оксиапатит (40% по массе) заплавлен внутри сферических (60—180 мкм) гранул 4%-ной химически спитой агарозы. Колонки, заполненные этим сорбентом, выдерживают скорость элюции до 200 мл/см²·ч. Впрочем, при работе с макромолекулами из-за замедленной диффузии в геле агарозы приходится ограничиваться гораздо меньшей скоростью. ДНК с молекулярной массой более $5 \cdot 10^6$ в такую агарозу вообще практически не диффундирует, но для очистки молекул меньшего размера, например ДНК плазмид, этот сорбент очень удобен, поскольку о его прочности беспокоиться не приходится.

ТЕХНИКА КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В этой главе мы познакомимся с конструкциями колонок и аппаратурой как для жидкостной хроматографии при низком давлении (до 5 атм), так и для ЖХВД, а также с некоторыми техническими приемами, общими для всех методов колоночной хроматографии, разбору которых посвящены следующие пять глав. Своеобразная техника и аппаратура для ТСХ описаны в последней главе.

ХРОМАТОГРАФИЯ ПРИ НИЗКОМ ДАВЛЕНИИ

В основной комплект приборов для проведения обычного хроматографического эксперимента при низком давлении (рис. 18), помимо самой колонки, входят перистальтический насос, денситометр, регистратор и коллектор фракций. Рассмотрим последовательно варианты конструкций и особенности эксплуатации этих приборов, а также некоторых других вспомогательных устройств. Это рассмотрение будет дополнено краткими сведениями о наиболее популярных приборах каждого типа, серийно выпускаемых различными фирмами в 1983 г.

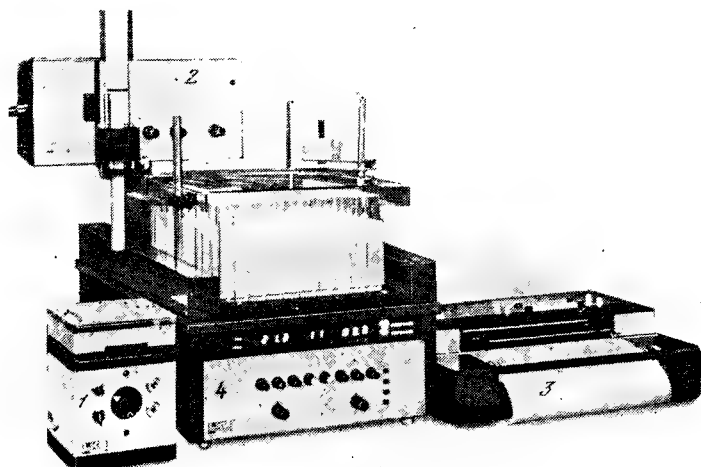


Рис. 18. Хроматографический комплект приборов фирмы «ЛКВ» (Швеция)
1 — перистальтический насос; 2 — денситометр; 3 — регистратор; 4 — коллектор фракций

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ КОЛОНКИ

Колонки, изготовленные в лаборатории

Два простейших варианта таких колонок изображены в разрезе на рис. 19. Слева представлена колонка для препаративного варианта хроматографии, без термостатирующей рубашки. В лабораторную стеклянную колонку диаметром до 8 см и длиной до 1,5 м. Сверху колонка снабжена стандартным шлифом № 14 или № 29, куда вставляется шлифованная пробка с капельницей. Последняя снабжена оливой малого диаметра, на которую можно надеть трубочку из силиконовой резины, куда вставляется тонкая (1—2 мм) полиэтиленовая или тефлоновая трубка от насоса. На нижний конец капельницы целесообразно надеть с некоторым перекосом кусочек полиэтиленовой трубочки так, чтобы при установке пробки на место трубочка почти касалась стенки колонки. Этим предотвращается взмучивание верхнего слоя сорбента при падении капли. Верхнюю половину поверхности шлифа смазывают силиконовой смазкой, но так, чтобы смазка не попадала внутрь колонки. В момент установки в гнездо пробку немного проворачивают. Если шлиф хорошо притерт, слой смазки должен быть прозрачным. Герметичность посадки пробки следует проверять перед каждым опытом — при неработающем насосе жидкость из колонки не должна вытекать. В более простом варианте шлифованную стеклянную пробку можно заменить на резиновую.

В нижнюю часть колонки заправляется стеклянный фильтр. Чтобы не забиваться, его поры должны быть заведомо меньшего размера, чем гранулы сорбента. Вместе с тем нежелательно, чтобы фильтр представлял собой большое сопротивление току элюента. Для сорбентов, используемых при обычной хроматографии низкого давления, с гранулами не мельче 30 мкм в поперечнике подходит стеклянный фильтр № 3. Однако он может постепенно забиваться, если используется сорбент, засоренный «пылью», образующейся при его истирании. Во избежание этого не следует пренебрегать описанной ниже операцией «отмучивания» сорбента. Следует также помнить о том, что стеклянный фильтр сорбирует некоторое количество белка или нуклеиновой кислоты. С этой точки зрения в качестве фильтров следует предпочесть полиамидные (наилон) или тефлоновые пористые пластинки. Однако колонку в этом случае придется делать сборной, что значительно усложняет ее конструкцию. Такие фильтры используются в продажных фирменных колонках.

Под фильтром, при переходе к сливной трубке малого диаметра образуется коническая полость. При изготовлении колонки надо стремиться к тому, чтобы объем этой полости был минимальным, так как в ней может происходить смешивание близко идущих фракций. На сливной трубке имеется такая же, как на пробке, олива для трубочки из силиконовой резины, куда вставляется тонкая трубка, идущая к денситометру. Резиновую трубочку удобно пережимать винтовым зажимом, «запирая» таким образом выход из колонки.

Иногда на сливную трубку для этой цели монтируют стеклянный пришлифованный кран, но лучше так не делать, поскольку кран может подтекать, а смазывать его рискованно из-за опасности попадания смазки в элюент.

Справа на рис. 19 изображен разрез колонки для аналитических опытов, снабженной термостатирующей рубашкой. Конструкция самой колонки точно такая же, и сверху к ней припаивают гнездо нормального шлифа № 14, хотя сама колонка может быть диаметром 5 мм (для более тонких колонок проще надеть резиновую переходную трубочку прямо на колонку).

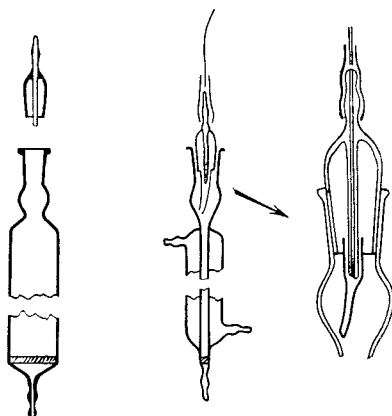


Рис. 19. Хроматографические колонки, изготовленные в лаборатории

Для проведения хроматографии на холоду или при фиксированной температуре на колонку напаивают (как можно ближе к фильтру и гнезду пробки) термостатирующую рубашку. Охлажденную или термостатированную воду насосом подают к нижнему выводу рубашки.

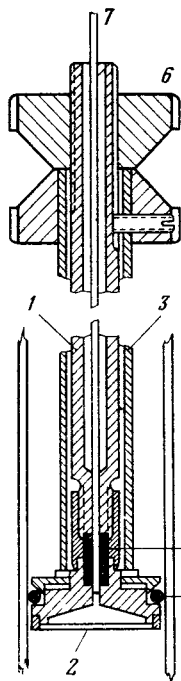
Для выполнения простейших операций очистки препарата (например, белка от радиоактивных «предшественников») нередко в качестве маленькой колонки используют пастеровскую или обычную пипетку, а еще чаще — баллончик от шприца на 1—2 мл. Вместо фильтра в выходной капал такой «колонки» помещают комочек хорошо промытой стеклянной ваты.

Фирменные колонки

Для простых хроматографических опытов фирма «Bio-Rad» предлагает набор относительно дешевых колонок типа «Econo-columns». Это стеклянные трубки диаметром от 5 до 25 мм и длиной от 4 до 170 см. На них надевают съемные полипропиленовые наконечники, снабженные люэровскими конусами. Нижний наконечник несет в себе диск из пористого полиэтилена. Есть варианты таких колонок, оснащенные термостатирующей рубашкой и даже адапторами с одного или обоих концов колонки. С помощью адаптора (плунжера) столб сорбента внутри колонки, даже заполненной лишь частично, можно ограничить пористой пластинкой и плоской конической камерой минимального объема не только снизу, но и сверху, со стороны подачи элюента. Это создает существенные удобства для внесения на колонку раствора препарата и улучшает условия элюции, особенно градиентной, когда в жидкости, находящейся над поверхностью сорбента, возможно перемешивание разных частей градиента. При ослабленной верхней гайке 6 (рис. 20) адаптор можно подвинуть в любое положение, вплоть до касания фильтра 2 с поверхностью сор-

Рис. 20. Конструкция адаптора

1 — корпус; 2 — фильтр; 3 — прижим; 4 — резиновое уплотнительное кольцо; 5 — уплотнение трубки; 6 — гайка прижима; 7 — тefлоновая трубка



бента. Затем, затягивая гайку, заставляют резиновое уплотнительное кольцо 4 раздаться по диаметру. При этом положение адаптора фиксируется и внутренний объем колонки оказывается герметизированным. С помощью двух адапторов можно осуществить элюцию колонки снизу вверх (восходящим током жидкости), что дает свои преимущества, например, при работе с очень мягкими матрицами.

Дорогие фирменные колонки оснащены устройствами для более совершенной фиксации и уплотнения наконечников, что позволяет подавать в них элюент под избыточным давлением 1—2 атм, а также запорными кранами игольчатого типа, съемными термостатирующими рубашками и др.

Популярны, особенно для гель-фильтрации, колонки фирмы «Pharmacia». Новая серия С включает колонки трех диаметров (1,0; 1,6 и 2,6 см) и пяти различных длин — от 10

до 100 см, что при наличии адапторов позволяет выбрать любой объем сорбента — от 1 до 500 мл. В стандартном обозначении колонок этой фирмы, например С_{16/70}, первая цифра указывает диаметр колонки в миллиметрах, а вторая — длину в сантиметрах. Колонки с термостатирующей рубашкой обозначаются индексом «IC». Аналогичного типа колонки производит фирма «LKB».

Некоторые фирмы выпускают толстостенные стеклянные колонки с уплотнениями, рассчитанными на давление до 30 атм. Так, фирма «Beckman» (ранее «Altex») предлагает широкий ассортимент таких колонок с диаметрами 2, 3, 6, 9, 15 и 25 мм (последние два диаметра рассчитаны на давления 20 и 7 атм соответственно), длиной от 5 до 100 см. Аналогичные параметры имеют колонки фирмы «Applied Science». Из дальнейшего будет видно, что такого рода колонки, рассчитанные на «средние» давления, представляют сейчас особый интерес в свете новых тенденций развития высокоэффективной хроматографии биологических макромолекул. Фирма «Pierce» для использования в аминокислотных анализаторах выпускает термостатируемые стеклянные колонки («Chromato Flo», серия E) диаметром 3 мм и длиной от 10 до 40 см, снабженные адапторами и рассчитанные на давление до 70 атм. Эта же фирма производит и обычные колонки низкого давления («Chromato Flo», серия A) диаметром от 9 до 50 мм.

Как уже указывалось, разрешающая способность хроматографического процесса существенно зависит от однородности размеров гранул сорбента, поэтому в особо ответственных случаях имеет смысл рассортировать сорбент так, чтобы отобрать фракцию гранул, размеры которых лежат в более узком интервале, чем у исходного продажного материала. Для этой цели удобно воспользоваться простой системой (рис. 24). Поднимая или опуская сосуд 1, можно изменять общую объемную скорость течения воды через коническую делительную воронку 3. По мере расширения конуса линейная скорость подъема воды в нем уменьшается; в соответствии с градиентом этой скорости материал сорбента расслаивается по высоте воронки на фракции гранул различного размера. Постепенно увеличивая напор воды, можно через сливную трубку 4 отбирать одну такую фракцию за другой.

Если в этом нет нужды, то следует по крайней мере позаботиться о том, чтобы удалить «пыль» — мелкие обломки материала сорбента («fines»), которые могут засорять промежутки между гранулами. Результатом засорения явится не только замедление течения элюента через колонку, но и неоднородность этого течения, что, как мы знаем, приведет к размыванию хроматографических зон. Мелкие обломки гранул могут образоваться в ходе перемешивания суспензии сорбента при его промывке, а также неизбежно возникают вследствие истирания при транспортировке сорбента в виде сухого порошка (в частности, и по этой причине многие сорбенты сейчас поставляют в виде суспензий).

Удаление мелких частиц осуществляют с помощью операции «отмучивания». Разбавленную суспензию набухшего, промытого и переведенного в нужный буфер (см. ниже) сорбента заливают доверху в мерный цилиндр, объем которого в 5—6 раз больше, чем объем упакованного влажного сорбента, и дают ему осесть до того момента, когда между слоем сорбента и мутной жидкостью над ним обозначится резкая граница. Гранулы смолы или сефадексов оседают относительно быстро — за несколько минут (в зависимости от их среднего размера), а целлюлоза — медленнее (за 10—30 мин). Жидкость над осадком вместе со взвешенными в ней мелкими частицами отсасывают и отбрасывают. Снова дополняют цилиндр буфером, осторожно палочкой взмучивают осадок по всему объему цилиндра и повторяют описанную операцию до тех пор (3—5 раз), пока жидкость над только что образовавшимся осадком не будет совершенно прозрачной. Затем выжидают еще некоторое время (до полного оседания слоя сорбента), измеряют его высоту линейкой и отсасывают буфер — на этот раз не полностью, а до такого уровня, чтобы слой жидкости составлял половину высоты осадка. Такое соотношение при взмучивании позволяет получить кашу («slurry»), консистенция которой наиболее удобна для заливки в колонку.

Подготовка к набивке хорошо промытой колонки состоит в том, что конец сливной трубки погружают в стакан с буфером, а в гнездо

верхнего шлифа вставляют пробку с трубкой, которую присоединяют к водоструйному насосу, после чего на короткое время отпускают зажим на сливной трубке. При этом жидкость энергично всасывается в колонку снизу через фильтр (рис. 22, а), чем достигается удаление воздуха из фильтра. Теперь можно пробку вынуть, а излишку жидкости дать вытечь, чтобы над фильтром остался слой, толщина которого примерно равна диаметру колонки. В гнездо шлифа устанавливают удлинительную трубку такого же диаметра, как колонка, но вполтину более короткую, а в нее вставляют воронку (рис. 22, б). Фирма «Pharmacia» для этой цели предоставляет специальный резервуар плавного расширяющегося профиля, который крепится на верхний наконечник фирменной колонки. Объем его должен быть не меньше половины объема колонки (рис. 22, в).

Кашицу сорбента осторожно взбалтывают и отбирают в мерный стакан объем, равный 1,5 объемам предполагаемой рабочей части колонки. Колонку вместе с удлинительной трубкой слегка наклоняют и, еще раз взболтав кашицу в стакане, выливают сразу все его содержимое в воронку или резервуар. Кашица должна стекать по стенке колонки; в случае образования пузырей воздуха они поднимутся через не слишком густой слой (жидкая суспензия нехороша тем, что во время заливки в ней могут образоваться вихревые потоки, приводящие к рассортировке гранул сорбента по размерам). После этого колонку устанавливают вертикально и на место воронки в верхний конец удлинительной трубки вставляют пробку с трубочкой, присоединенной к насосу (резервуар плотно закрывают крышкой с такой же трубочкой).

Прежде чем освободить зажим на сливной трубке, надо подумать о том, можно ли допустить протекание через колонку жидкости со скоростью, задаваемой перепадом ее уровней в удлинительной трубке (или резервуаре) и на выходе из колонки, — такая ситуация возникает в момент отсоединения насоса от удлинительной трубки. Для мягких сортов сефадекса (см. гл. 4) это может оказаться недопустимым. Тогда на сливную трубку надо надеть так называемую «защитную петлю» (рис. 23, а). Теперь гидравлический напор при свободном вытекании жидкости будет определяться расстоянием H , которое можно выбрать произвольно. Заметим попутно, что термин «защитная петля» употребляют и для обозначения системы, показанной на рис. 23, б. Ее назначение совсем иное — предохранить колонку от обсыхания в ходе элюции, если весь запас элюента в колбе будет израсходован (например, при элюции в ночное время). После того как жидкость в левом колене трубки опустится до уровня А, истечение жидкости из колонки прекратится.

Решив вопрос о защитной петле, можно освободить зажим на сливной трубке и включить насос для подачи в удлинительную трубку буфера с рабочей скоростью элюции. В таком режиме следует прокачивать буфер до тех пор, пока уровень сорбента не опустится до своего почти окончательного положения в колонке. После этого можно отсоединить насос и дать возможность буферу из удлинительной трубки полностью войти в колонку, а удлинительную трубку (или

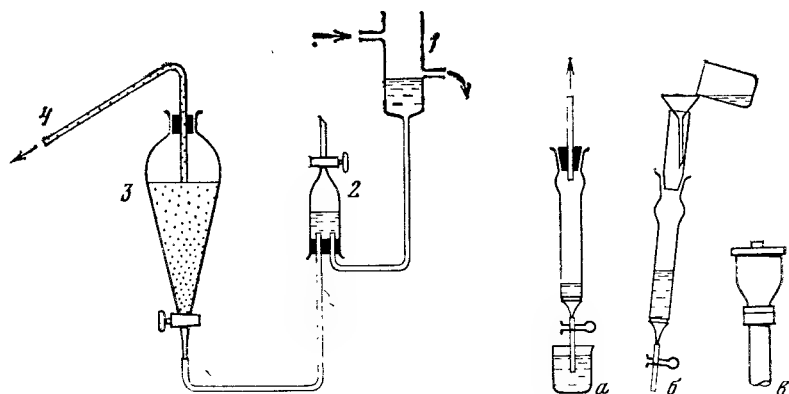


Рис. 21. Система для фракционирования гранул сорбента по размерам
1 — сосуд с неизменным уровнем воды; 2 — ловушка для воздуха; 3 — делительная воронка; 4 — трубка для сбора фракций

Рис. 22. Зановление хроматографической колонки

a — удаление воздуха; *б* — заливка «кашицы» сорбента через удлинительную трубку; *в* — резервуар для заливки колонки фирмы «Pharmacia»

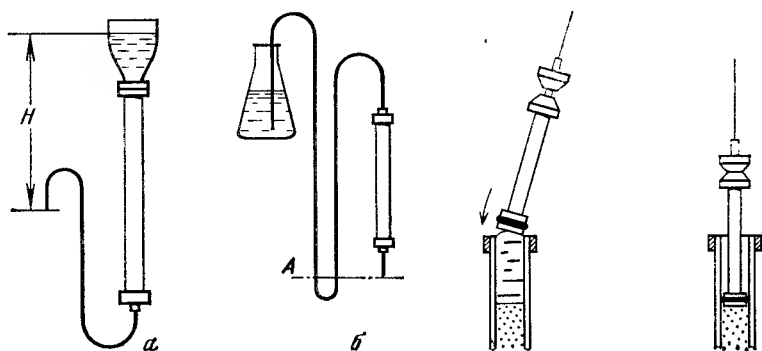


Рис. 23. Защитные петли для уменьшения скорости течения элюента через колонку (*a*) и для предотвращения обсыхания колонки (*б*)

Рис. 24. Установка адаптора в колонку

резервуар) снять. Теперь можно, перекрыв слив, установить на место верхнюю пробку колонки или адаптор. При установке последнего необходимо принять меры предосторожности против возможного задержания пузырьков воздуха на поверхности его фильтра. Для этого следует поступать так, как схематически показано на рис. 24. Колонку заполняют доверху буфером, ослабляют зажим уплотнительной резинки на адапторе и начинают погружать его в наклонном положении так, чтобы воздух вышел из клиновидного зазора между фильтром и жидкостью. Потом адаптор осторожно опускают до уровня

сорбента. В конце этого движения понемногу зажимают резинку, с тем чтобы заставить жидкость заполнить трубку адаптора. Когда фильтр коснется сорбента, резинку затягивают окончательно, фиксируя адаптор в колонке. Смонтированную таким образом колонку уравнивают током буфера на рабочей скорости в течение нескольких часов, пропуская не менее двух полных объемов колонки. Если за это время уровень сорбента несколько понизится, то адаптор, ослабив резинку, подвигают к нему снова и закрепляют в окончательном положении.

Описанная процедура набивки колонки пригодна для любого гранулированного сорбента. Волокнистую целлюлозу, ввиду ее упругости, лучше вносить последовательно, порциями, поднимаясь с каждой порцией примерно на 8 см по высоте колонки. Следует приготовить более густую кашицу с соотношением 1,25 : 1 вместо 1,5 : 1, заполнить ею шприц, снабженный длинной трубкой, и через нее выдавить кашицу прямо на дно колонки. Затем необходимо долить в колонку буфер и прокачать его в течение 20—30 мин со скоростью, превышающей рабочую скорость элюции (например, 50 мл/см²·ч). После этого колонку открывают, дают буферу стечь так, чтобы над сорбентом остался слой толщиной около 2 мм. Из шприца вносят новую порцию целлюлозы, палочкой перемешивают ее с верхней частью предыдущей порции и снова прокачивают буфер, как указано выше, и так далее до самого верха колонки.

Короткую колонку (длиной до 20 см) можно набить на $\frac{3}{4}$ ее высоты без помощи удлинительной трубки. Прямо в колонку можно залить более густую, чем описано выше, кашицу сорбента (1,15 : 1), затем сразу же ввести адаптор и начать прокачку буфера, в ходе которой сорбент оседает до своего окончательного уровня.

Колонки малого диаметра удобно заполнять в перевернутом положении, засасывая жидкую кашицу сорбента с помощью водоструйного насоса. Колонка заполняется за несколько секунд. После этого можно зажать трубку, ведущую к насосу, вынуть колонку из стакана и перевернуть. Излишек сорбента с верхнего конца колонки отсасывают, а далее, как обычно, уравнивают колонку прокачкой буфера с рабочей скоростью элюции.

РЕЗЕРВУАРЫ ДЛЯ ЭЛЮЕНТА. СМЕСИТЕЛИ ГРАДИЕНТА

Изократическая элюция

В качестве резервуара для элюента проще всего использовать коническую колбу или бутылку с изогнутой полиэтиленовой трубкой (рис. 25, а), на конец которой надевают силиконовую резинку. В трубку с помощью шприца засасывают жидкость из колбы так, чтобы образовался сифон, и затыкают ее оплавленным кусочком стеклянной палочки. Горловину колбы во избежание попадания пыли в элюент следует закрыть ватным тампоном или фольгой.

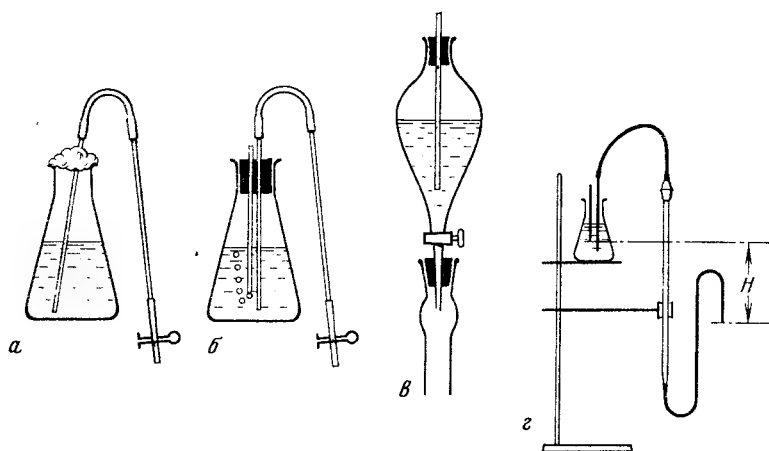


Рис. 25. Резервуары для элюента при изократической элюции

a — обычная колба, закрытая ватным тампоном от пыли; *б, в* — варианты колбы Мариотта; *г* — определение гидравлического напора в системе с защитной петлей и колбой Мариотта

Если элюция колонки осуществляется без насоса («самотеком»), то при снижении уровня жидкости в колбе будет уменьшаться гидростатический напор, а следовательно, и скорость элюции. Чтобы избежать этого, можно воспользоваться колбой Мариотта (рис. 25, *б*). Она отличается от обычной лишь тем, что в ее горловину плотно вставлена резиновая пробка, в которой закреплена еще одна (дренажная) трубка, немного не достающая до дна колбы и открытая в атмосферу. При вытекании элюента из колбы Мариотта над его уровнем начнет создаваться разрежение, уровень жидкости в дренажной трубке будет снижаться, а затем через нее в свободный объем над элюентом пузырьками начнет поступать воздух. Этому моменту отвечает равенство суммы давлений слоя элюента и разреженного воздуха над ним атмосферному давлению, которое будет сохраняться до тех пор, пока уровень элюента не опустится до конца дренажной трубки. Таким образом, колба Мариотта ведет себя как открытый сосуд, в котором уровень жидкости остается неизменным на высоте нижнего конца дренажной трубки. От этой высоты в замкнутой гидравлической системе, куда входит и колонка, следует отсчитывать перепад уровней, создающий гидравлический напор H (рис. 25, *г*). Когда система замкнута, колбу Мариотта (так же как открытую колбу) можно опускать или поднимать, изменяя величину напора H и скорость элюции. Можно опускать колбу и ниже верхнего конца колонки. Замкнутая гидравлическая система работает как сифон. В этом случае особенно важно быть уверенным в герметичности посадки пробки в гнездо колонки. На рис. 25, *в* показан другой популярный вариант колбы Мариотта, в котором используется делительная воронка, установленная непосредственно на колонку.

Градиентная элюция

О преимуществах элюции непрерывно изменяющейся концентрацией соли (или pH) было сказано в гл. 1. Технически «непрерывный градиент» проще всего осуществить, используя систему двух цилиндрических сообщающихся сосудов (рис. 26, *a*; *б* — упрощенный вариант с обычными стаканами). Сосуды следует прикрыть фольгой или (неплотно) крышками, с тем чтобы уменьшить испарение воды в процессе элюции. Систему в целом обычно называют «смесителем градиента». Термин не очень удачен, так как действительно смесителем служит только сосуд *B*, откуда элюент поступает на колонку. Жидкость в смесителе перемешивают с помощью магнитной мешалки. Сосуд *A* служит резервуаром, из которого жидкость с иным, чем в смесителе, значением фактора элюции поступает в сосуд *B*. Чаще всего таким фактором является повышенная концентрация буфера или соли. Обозначим первоначальные концентрации вещества в резервуаре и смесителе соответственно символами C_A и C_B , исходные объемы жидкостей в них — V_A и V_B , а площади сечения самих сосудов — S_A и S_B . Пусть V обозначает текущий объем, поступивший из смесителя в колонку с момента начала элюции, а C_V — концентрацию на выходе системы после вытекания из нее объема V . Интегрирование простого дифференциального уравнения равновесного течения жидкости в этой системе дает следующую зависимость C_V от V :

$$C_V = C_A - (C_A - C_B) \left(1 - \frac{V}{V_A - V_B} \right)^{\frac{S_A}{S_B}}. \quad (25)$$

При одинаковом сечении сосудов ($S_A = S_B$) формула упрощается:

$$C_V = C_B + (C_A - C_B) \frac{V}{V_A - V_B}. \quad (26)$$

Она описывает линейный закон зависимости C_V от V , т. е. «линейный градиент» элюции. В момент начала элюции, когда $V = 0$, $C_V = C_B$, а к моменту одновременного опорожнения обоих сообщающихся сосудов, когда $V = V_A + V_B$, $C_V = C_A$.

Если диаметр резервуара больше, чем у смесителя, т. е. $S_A > S_B$, то концентрация раствора в смесителе вначале нарастает быстрее, чем по линейному закону, а в конце элюции тоже оказывается равной C_A , как видно из формулы (25) при $V = V_A + V_B$. Отсюда следует, что форма градиента будет выпуклой по отношению к оси V (рис. 27). Аналогично, если диаметр резервуара меньше, чем диаметр смесителя ($S_A < S_B$), то градиент будет вогнутым.

Начинают заполнение смесителя градиента с резервуара, перекрыв канал, соединяющий два сосуда. Потом пропускают немного жидкости в канал, так чтобы она показалась в сосуде смесителя, а затем уже заполняют и его. На рис. 28 показана схема «принудительного» образования линейного градиента с помощью трехканального перистальтического насоса. Для того чтобы жидкость из смесителя *B* вытекала со скоростью, вдвое большей, чем скорость поступления в него жидкости из резервуара *A* (это эквивалентно

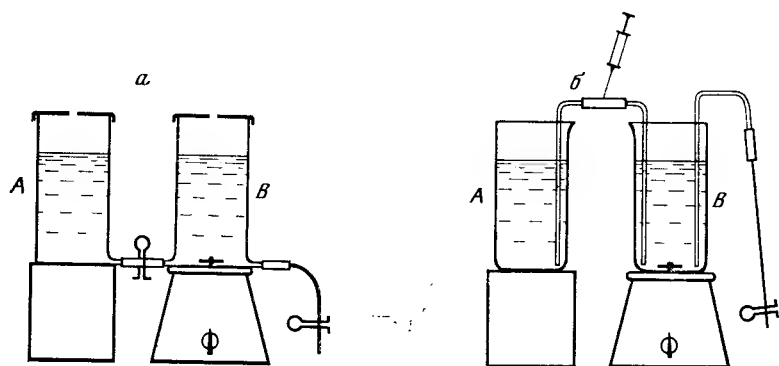


Рис. 26. Смесители градиента (см. текст)

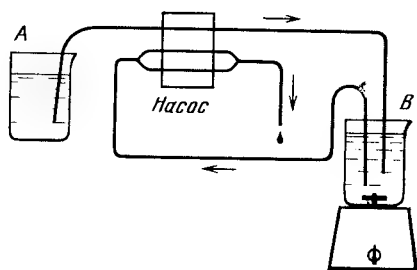
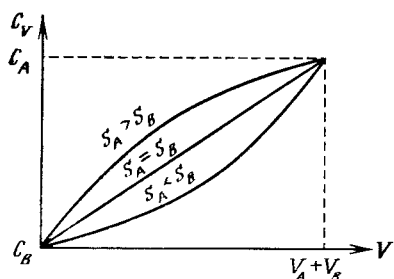


Рис. 27. Форма градиента концентрации элюента (см. текст)

Рис. 28. Схема «принудительного» образования линейного градиента с помощью насоса

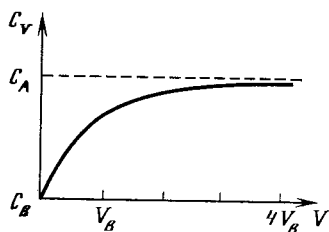
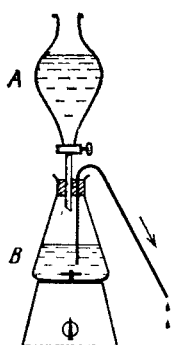


Рис. 29. Образование экспоненциального градиента элюции

Рис. 30. Форма экспоненциального градиента концентрации элюента (см. текст)

сохранению равенства уровней в сообщающихся сосудах), откачка из смесителя идет через два соединенных параллельно канала насоса.

В системе, изображенной на рис. 29, объем жидкости в смесителе B остается неизменным: из резервуара A в него втекает столь-



Рис. 31. Спираль для сохранения предварительно созданного градиента концентрации элюента при элюции микроколонки

ко же жидкости, сколько вытекает в колонку (то же самое произойдет, если закрыть пробкой смеситель в системе сообщающихся сосудов). В этом случае закон изменения C_V описывается следующей формулой:

$$C_V = C_A - (C_A - C_B) e^{-\frac{V}{V_B}}. \quad (27)$$

Поскольку e — основание натуральных логарифмов, создаваемый градиент называют экспоненциальным. Отметим, что в выражение (27) не входит начальный объем жидкости в резервуаре V_A . Этот объем не влияет на характер градиента, лишь бы его хватило на проведение хроматографического эксперимента (впрочем, сосуд A можно пополнять по ходу элюции). Величина C_V приблизится к C_A только после того, как через колонку пройдет объем жидкости, в несколько раз больший, чем объем смесителя, т. е. при $V \gg V_B$ (рис. 30). При $V = V_B$ $C_V \approx C_B + 0,63 (C_A - C_B)$.

Если необходимо задать сложный закон изменения концентрации элюента в ходе элюции (градиент произвольной формы), то можно воспользоваться одним из продажных приборов, где профиль градиента вырезают из специальной бумаги в виде шаблона, вдоль которого затем перемещается следящий фотоэлемент. Положение фотоэлемента задает с помощью двух клапанов соотношение периодов попеременной подачи в смеситель жидкости из двух сосудов. Этим соотношением определяется концентрация раствора, поступающего на колонку. Фирма «Gilson» (Франция) поставляла такой прибор под торговым названием «Mixograd», фирма «ЛКВ» (Швеция) — под названием «Ultrograd». Сигналом от датчика, связанного с денситометром, можно остановить продвижение фотоэлемента вдоль профиля градиента на время выхода пика вещества из колонки. Пик элюируется изократически, после чего подача градиента возобновляется.

Градиент малого объема (в несколько миллилитров) можно предварительно ввести в спираль, скрученную из полиэтиленовой трубочки диаметром 1—2 мм и длиной в несколько метров, отводя в нее часть жидкости, вытекающей из смесителя градиента большего объема. В ходе элюции микроколонки этот градиент выдавливают из спирали гидравлическим напором; в тонкой и длинной спирали градиент не смешивается (рис. 31). В спирали можно заготовить и последовательность различных растворов для элюции ступенчатым градиентом.

ВНЕСЕНИЕ ПРЕПАРАТА В КОЛОНКУ

Исходный препарат в большинстве случаев вносят на хроматографическую колонку растворенным в том же буфере, каким уравновешена сама колонка. Перевести препарат в этот буфер можно диализом или гель-фильтрацией. Надо проследить за тем, чтобы раствор препарата был прозрачен, т. е. свободен от частиц осадка или пыли. При необходимости его следует осветлить центрифугированием или отфильтровать.

В открытую колонку (без адаптора) препарат вносят вручную из пипетки. Начинают с того, что спускают жидкость из колонки так, чтобы открылся (но не начал обсыхать!) слой сорбента. Затем сливную трубку зажимают. Раствор препарата осторожно, чтобы не взмутить сорбент, заливают по стенке колонки, начиная от расстояния в 1 мм над поверхностью сорбента и постепенно вместе с уровнем раствора препарата продвигая кончик пипетки вверх по стенке. После того как весь объем препарата внесен в колонку, сливную трубку освобождают от зажима и дают слою препарата войти в сорбент до того момента, когда его поверхность снова обнажится. Так же, как описано, вносят объем элюента, равный объему препарата, а затем спускают его в сорбент. Такую промывку стенок колонки целесообразно повторить еще раз. После этого заливают (так же) некий объем элюента (на высоту 1—2 см) и вставляют верхнюю пробку с капельницей. Слой свободного элюента предназначен для того, чтобы обеспечить образование некоторого разрежения над сорбентом, необходимого для всасывания жидкости из резервуара, если он располагается ниже верха колонки при элюции без насоса (образование сифона), или для предотвращения обнажения верхнего слоя сорбента при неработающем насосе и открытом сливе из колонки (в первый момент после открывания слива из колонки вытекает немного жидкости, затем, если система герметична, вытекание прекращается). Вместе с тем следует иметь в виду, что в слое свободного элюента над сорбентом происходит перемешивание градиента, поэтому в случае градиентной элюции высота этого слоя должна быть минимально необходимой. После того как внесение препарата и подготовка колонки закончены, можно присоединить резервуар или насос, открыть сливную трубку и начать элюцию.

В некоторых случаях в раствор препарата добавляют сахарозу и вносят этот раствор под слой свободного элюента, как при электрофорезе в вертикальных трубках. Как правило, в этом нет необходимости.

Особенно удобно и просто вносить раствор препарата в колонку с адаптором. Препарат, например из шприца, вносят прямо через трубочку адаптора. Он поступает сначала в плоскую коническую полость последнего, а затем через фильтр — равномерно на всю поверхность сорбента. Вслед за раствором препарата в трубочку адаптора подают элюент от насоса или из резервуара и прямо начинают элюцию. Однако в этой простоте кроется один «подводный

камень». Ни в коем случае нельзя допустить попадания в трубочку адаптора пузырька воздуха, который под давлением идущей за ним жидкости доходит до конической полости адаптора и там застревает. В результате часть поверхности фильтра оказывается недоступной для жидкости, однородность распределения препарата или элюента нарушается, а это может привести к существенному ухудшению разрешающей способности колонки.

Следовательно, особое внимание необходимо уделять тщательности соединения трубок. На рис. 32 в качестве примера показан момент присоединения трубки от резервуара к трубке адаптора.

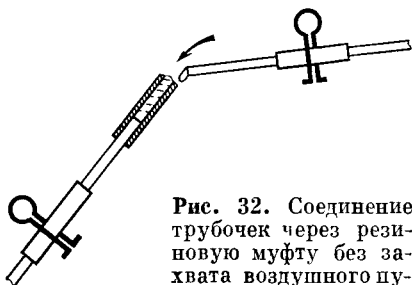


Рис. 32. Соединение трубочек через резиновую муфту без захвата воздушного пузыря (см. текст)

Расположенная внизу, она заканчивается соединительной резиновой. Эта трубка должна быть до конца заполнена жидкостью, чтобы наружу выступал выпуклый мениск. Если жидкости в резинке недостаточно, то ее можно пополнить через иглу из шприца. Слив из колонки в это время, разумеется, должен быть перекрыт. Верхняя трубка от резервуара присоединена тоже через резинку, которую можно пережать зажимом в тот момент, когда из трубки капает

жидкость, так что капля повиснет на конце трубки. Теперь этот конец надо вставить в резинку адаптора. Капля сливается с мениском, лишняя жидкость при вдвигании трубки выдавливается, и воздух не может попасть внутрь. Эту операцию надо повторять каждый раз, когда приходится разъединять и снова соединять трубки, например при переходе от внесения препарата к элюции или при смене элюентов. Общее правило здесь таково: отток жидкости по трубкам от места соединения должен быть перекрыт. Приток возможен — при некотором навыке трубку, идущую от резервуара или насоса, можно вставить и в тот момент, когда из нее капает жидкость. Для удобства можно шприц с препаратом и трубку от резервуара присоединить к трехходовому крану (но так, чтобы в него не попал воздух), а выход из крана — к адаптору. Тогда переход от внесения препарата к началу элюции осуществится просто поворотом крана.

Для хроматографических систем, работающих при повышенном давлении (до 20 атм), разработаны и выпускаются разнообразные инжекторные краны. Имеются в продаже двух-, четырех- и шестипозиционные краны, как вращающиеся с петлей для препарата, подобно тому как описано ниже для инжекторов высокого давления, так и переключающиеся путем поступательного движения. Есть краны с ручным управлением, а есть и с пневматическим или дистанционным от электромотора (фирмы «Rheodyne», «Whatman» и др.). Для соединения между собой трубок, работающих под давлением в несколько атмосфер, вместо простых и удобных резинок прихо-

дится использовать специальные переходники, где конический раструб, выполненный на конце тефлоновой трубки, накидной гайкой прижимают к конусу переходника или же конец трубки уплотняется в переходнике резиновой прокладкой, которую тоже обжимает гайка.

ПЕРИСТАЛЬТИЧЕСКИЕ НАСОСЫ

Для подачи элюента на хроматографическую колонку низкого давления (до 5 атм) используют перистальтические насосы. В них жидкость не контактирует ни с чем, кроме трубки из силиконовой резины или «тайгона», внутри которой она находится. Насосы обеспечивают минимум пульсаций потока и возможность плавной регулировки скорости подачи — от сотых долей миллилитра до сотен миллилитров в час. Перистальтические насосы выпускаются двух типов: роликовые и планетарные.

Схема роликового насоса показана на рис. 33. Резиновую трубку пережимают ролики, смонтированные по периферии вращающегося диска. Продвигаясь вдоль трубки, каждый из роликов поочередно продавлиывает через нее жидкость в направлении своего движения. Степень сжатия трубки можно регулировать с помощью винта, прижимающего профилированную направляющую пластину, к которой прилегает трубка. Нередко конструкция насосов позволяет варьировать диаметр трубок, например в пределах от 1 до 3 мм, что дает возможность переходить от одного диапазона скоростей подачи элюента к другому. Внутри каждого диапазона плавная регулировка скорости подачи осуществляется изменением скорости вращения диска с роликом. Эту скорость удается изменять в очень широких пределах благодаря использованию «шаговых электромоторов», работа которых контролируется длительностью и частотой электрических импульсов, вырабатываемых встроенным в насос электронным генератором импульсов (при очень малых скоростях подачи жидкости можно заметить, что насос работает толчками). Многие фирмы выпускают многоканальные насосы, где ролики пережимают одновременно несколько параллельно лежащих трубок одинакового диаметра, обеспечивая подачу жидкости с одинаковой скоростью по трем и более каналам.

На фотографии (рис. 34) показан трехканальный перистальтический насос фирмы «Pharmacia» (тип Р-3). Хорошо видны ролики, съемный блок с направляющими пластинами и винты для индивидуальной регулировки поджатия каждой пластины. Эта же фирма выпускает и надежный малогабаритный одноканальный насос (тип Р-1). Для удобства эксплуатации во многих насосах предусмотрена возможность с помощью тумблера мгновенно переключать направление подачи жидкости на обратное, а также возможность, не меняя регулировки рабочей скорости, на время пустить насос на максимальные обороты. Последняя модель роликового перистальтического насоса фирмы «LKB» с торговым названием «Micro Perrex» (диапазон скоростей 0.5—500 мл/ч) оснащена микропроцессором, осу-

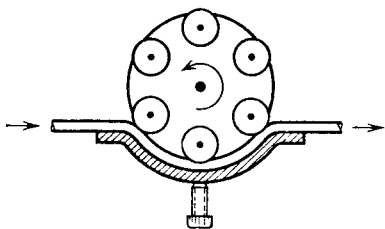
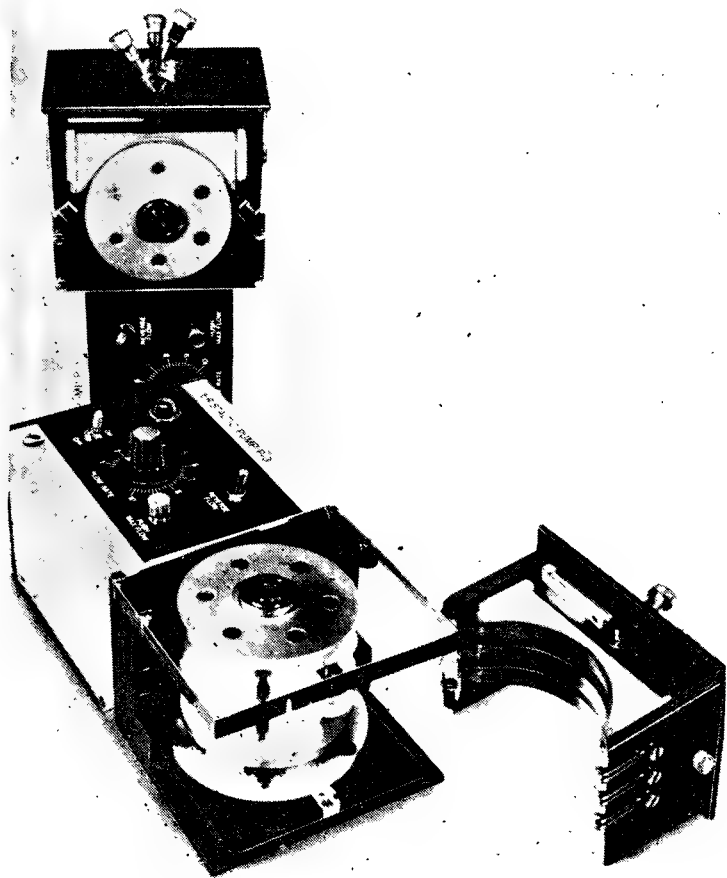


Рис. 33. Схема перистальтического насоса роликового типа

Рис. 34. Трехканальный перистальтический насос фирмы «Pharmacia»



ществляющим (и запоминающим) калибровку скорости подачи жидкости, и цифровым индикатором скорости. Генератор импульсов этого насоса стабилизирован кварцем.

Современные перистальтические насосы (в том числе «Pharmacia» Р-1 и «Мисго Регрех») могут управлять работой коллектора фракций, подавая ему команду на смену пробирок после прокачивания заранее заданного объема фракции. Такая возможность имеется и у

насоса «Minipuls» фирмы «Gilson», который оснащен сменными головками на 1, 2, 4 или 8 каналов и может создавать давление до 5 атм в интервале скоростей 0,06—6000 мл/ч. Перистальтические насосы роликового типа выпускают также фирмы «ISCO» (модель 1612, двухканальный) и «Desaga» («STA — Multipurpose peristaltic pump», шестиканальный).

Роликовые насосы любой конструкции имеют один общий недостаток — проскальзывая по резиновой трубке, ролики постепенно ее изнашивают. В связи с этим были разработаны конструкции перистальтических насосов планетарного типа (рис. 35). Как и в роликовом насосе, расположенные по периферии ролики здесь пережимают трубку, опирающуюся на направляющую пластину. Разница заключается в том, что ролики не проскальзывают, а катятся по трубке. Это достигается тем, что они приводятся во вращение (в обратную по отношению к их движению вдоль трубки сторону) от центрального ролика. Такую «планетарную» систему использовала до последнего времени в своих насосах фирма «LKB» (одноканальная модель «Vario Perrex» с диапазоном скоростей 0,2—400 мл/ч и четырехканальная модель «Multi Perrex» с диапазоном 5—5000 мл/ч в каждом канале). Планетарные насосы выпускает также фирма «Desaga» — «Micro PLG — peristaltic pump» (два канала; 0,1—50 мл/ч) и «PLG — multipurpose peristaltic pump» (шесть каналов; 0,5—4500 мл/ч).

Однако планетарная система, базирующаяся на трении, имеет свой недостаток — постепенно истираются трущиеся друг о друга ролики, так что центральный ролик начинает проскальзывать. Вероятно, по этой причине фирма «LKB» в своей последней модели «Micro Perrex» вернулась к системе роликового перистальтического насоса. В последней модели насоса «WIZ» фирмы «ISCO» планетарная система роликов, катящихся по трубке, приводится в движение с помощью зубчатой передачи. Этот четырехканальный насос можно использовать в качестве дозатора заданного объема жидкости («dispenser»), а также как устройство, осуществляющее разбавление препарата в заданное число раз («diluter»).

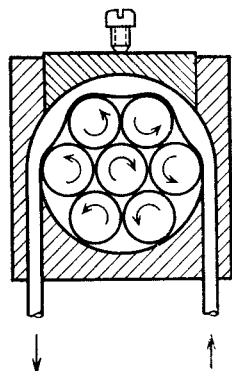


Рис. 35.
Схема
перистальтического
насоса планетарного
типа

ДЕТЕКТОРЫ

Назначение детектора — вести непрерывную регистрацию какого-либо физического параметра в токе выходящего из колонки элюента для обнаружения и количественной оценки ширины и амплитуды пика вещества. На практике чаще всего пользуются возможностью регистрации одного из трех параметров: оптической

плотности раствора, флюоресценции или радиоактивности. Имеются детекторы, регистрирующие изменение коэффициента преломления жидкости или ее электропроводности, но для хроматографии белков и нуклеиновых кислот они широкого распространения не получили. Детекторы, регистрирующие радиоактивность препарата, выходящего в токе жидкости, были упомянуты в предыдущей книге при подробном рассмотрении методов регистрации радиоактивности. Их чувствительность невысока, так что используются они относительно редко. Детекторы флюоресценции обеспечивают очень высокую чувствительность обнаружения элюируемого вещества, поэтому в последние годы они используются все чаще. Однако при этом требуется дополнительная операция окраски вещества флюоресцентным красителем, поэтому наиболее широко используются детекторы, регистрирующие оптическую плотность элюента (поглощение света веществом).

Большинство аминокислот практически не поглощает свет в доступной для регистрации области, так что их приходится окрашивать нингидрином. Этот метод окраски будет подробно рассмотрен в приложении 2, посвященном аминокислотным анализаторам. Пептиды и белки поглощают свет в области 206—215 нм за счет пептидной связи и в широкой области спектра с максимумом вблизи 280 нм за счет присутствия в них ароматических аминокислот. Азотистые основания и нуклеиновые кислоты хорошо поглощают вблизи 260 нм. Поэтому не удивительно, что основной метод детектирования в хроматографии белков и нуклеиновых кислот — это регистрация поглощения света в ультрафиолетовой области спектра. Соответствующие приборы мы будем для краткости именовать УФ-детекторами.

УФ-детекторы

Главным элементом детектора является источник ультрафиолетового света. В качестве такового широко используют ртутную лампу низкого давления. Более 90% испускаемого ею света приходится на долю яркой спектральной полосы с длиной волны 254 нм. Это особенно удобно для регистрации нуклеиновых кислот и их компонентов. Излучение с длиной волны вблизи 280 нм можно получить с помощью той же лампы, если ее светом облучать флюоресцирующий на этой длине волны «вторичный» источник света. Такая система использовалась, например, до недавнего времени фирмой «LKB» в детекторах типа «Uvicord I» и «Uvicord II». В новой модели УФ-детектора «Uvicord S» эта фирма устанавливает безэлектродную газоразрядную лампу, дающую сильную линию испускания света с длиной волны 206 нм и широкий максимум вблизи 280 нм. Для чувствительной регистрации поглощения вблизи 254 нм в этот прибор можно установить и обычную ртутную лампу низкого давления. Регистрация поглощения белковых растворов при 206 нм позволяет значительно повысить чувствительность детектора (например, для γ -глобулина — в 40 раз), поскольку при 206 нм

поглощает каждая пептидная связь, в то время как при 280 нм — только ароматические аминокислоты, число которых в составе белка может быть невелико.

В УФ-детекторах фирмы «Pharmacia» UV-1 и UV-2 установлена ртутная лампа низкого давления, в новой модели UV-1/214, предназначенной специально для регистрации белков и пептидов, ее заменяет цинковая лампа низкого давления, имеющая яркую полосу свечения при 214 нм. Использование дейтериевой лампы и монохроматоров в детекторах для обычной хроматографии практикуется редко ввиду дороговизны этих приборов и малой интенсивности света. Такие монохроматоры применяются для высокочувствительной ЖХВД.

Большое внимание в конструкции УФ-детекторов уделяется стабилизации интенсивности света лампы, поскольку от этого зависит стабильность нулевой линии регистратора. Используется термостатирование ламп и отрицательная обратная связь от интенсивности света к напряжению питания лампы.

Важную роль в устройстве детектора играет рациональная конструкция кювет, исключающая возможность образования областей застоя жидкости. Применяются как цилиндрические, так и прямоугольные кварцевые кюветы объемом в несколько десятков микролитров с длиной оптического пути от 2 до 10 мм. В конструкции УФ-детектора UV-2 применена система одновременного прохождения света по двум путям (рис. 36): вдоль длины прямоугольной кюветы (20 мм) и в поперечном направлении (1 мм). Если такой прибор укомплектовать двухканальным регистратором (например, «REC-482» фирмы «Pharmacia»), то можно при одном и том же усилении сигнала с фотоэлементов вести регистрацию одновременно на двух значениях чувствительности, отличающихся друг от друга в 20 раз. Это позволяет заметить пик малого поглощения и одновременно прописать форму интенсивных пиков от сильно поглощающих компонентов смеси веществ. Многие фирмы строят свои УФ-детекторы по двухлучевой схеме: прибор оснащается дополнительной кюветой сравнения, через которую может протекать чистый элюент, а луч света от лампы с помощью полупрозрачного зеркала расщепляется и проходит параллельно через две кюветы — рабочую и кювету сравнения. Двухлучевая схема позволяет исключить из регистрации собственное поглощение элюента, которое может изменяться в ходе градиентной элюции, а также компенсирует изменения яркости лампы, упрощая решение проблемы ее стабилизации.

В качестве приемников энергии в детекторах используются высокочувствительные фотоэлементы. Напряжение с нагрузки фотоэлемента усиливается логарифмическим усилителем, на выходе которого образуется «сигнал» напряжения, пропорциональный оптической плотности детектируемого раствора, с амплитудой порядка 10 мВ. Этот сигнал и управляет положением пера потенциометрического регистратора. В зависимости от интенсивности поглощения света веществом с помощью переключателя диапазонов чувстви-

тельности можно задавать разные степени усиления усилителя, так чтобы отклонение пера от нулевой линии на всю ширину ленты регистратора (20—25 см) соответствовало максимальному значению оптической плотности раствора. Как хорошо видно на фотографии (рис. 37), каждый из двух усилителей УФ-детектора UV-2 имеет 8 диапазонов усиления в пределах от 0,1 до 20 оптических единиц для «поперечного луча» с длиной оптического пути в 1 мм и в пределах от 0,005 до 1 оптической единицы для луча, идущего вдоль кюветы. УФ-детекторы UV-1 и UV-2/214 фирмы «Pharmacia» также собраны по двухлучевой схеме со сменными кюветами с длиной оптического пути (только в одном направлении) 3 и 10 мм. Они укомплектовываются одноканальным регистратором REC-481.

Конструкторы фирмы «LKB» в модели «Uvicord III» использовали двухлучевую схему и автоматическое переключение диапазонов чувствительности для регистрации пиков большой амплитуды. Однако в уже упоминавшейся последней модели «Uvicord S» они вернулись к однолучевой схеме с 9 диапазонами чувствительности (от 0,005 до 2 единиц оптической плотности раствора на всю шкалу) и без автоматического переключения. По-видимому, это сделано в интересах удешевления прибора и повышения его надежности. Модель «Uvicord S II» можно укомплектовать сменными фильтрами для работы в длинноволновых участках спектра вблизи 313, 365 и 405 нм, т. е. для регистрации поглощения некоторых витаминов, антибиотиков, НАД-Н, гемоглобина и цитохромов. Фирма «LKB» предлагает свой потенциометрический регистратор (модель 2210), хотя надо заметить, что современные УФ-детекторы любой фирмы могут работать в сочетании с почти любым лабораторным регистратором потенциометрического типа. В каталоге изделий фирмы «LKB» сохраняет свое место и давно апробированный печатающий шестиканальный регистратор магнитоэлектрического типа с вертикальной лентой (модель 2065). Этот регистратор нельзя использовать с УФ-детекторами других фирм без специальных «согласующих» электронных цепей, так как его входное сопротивление очень мало по сравнению с сопротивлением любого потенциометрического регистратора.

Успешно конкурирующая с названными выше фирма «Gilson» выпускает двухлучевой УФ-детектор (модель 111-B), оснащенный ртутной лампой низкого давления, одна половина которой покрыта составом, фосфоресцирующим на длине волны 280 нм. Сменные кюветы на 1,3; 11 и 40 мкл с длиной оптического пути 5 и 10 мм рассчитаны на давления жидкости до 70 атм. Прибор имеет 8 диапазонов чувствительности в интервале от 0,005 до 1 оптической единицы на всю шкалу. Эта же фирма выпускает спектрофотометр с монохроматором на дейтериевой лампе с интервалом длин волн от 190 до 600 нм и 8 диапазонами чувствительности от 0,01 до 2 оптических единиц на шкалу («НМ Holochrome») (рис. 38).

Фирма «Bio-Rad» выпускает простой двухлучевой УФ-детектор на длины волн 254 и 280 нм («UV Monitor», модель 1300). Аналогичные приборы поставляют фирмы «Pierce» («Chromato Flo») и «ISCO»

Рис. 36. Кювета для одновременной регистрации поглощения света по двум оптическим путям из УФ-детектора типа UV-2 фирмы «Pharmacia»

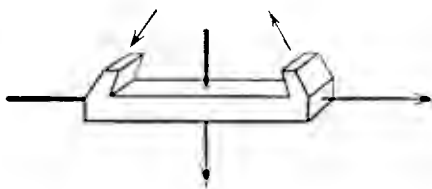


Рис. 37. УФ-детектор UV-2 («Pharmacia») с блоком питания



Рис. 38. Проточный УФ-спектрофотометр HM/Holochrome (фирмы «Gilson»)

(модель 226). Последняя фирма предлагает еще один многоцелевой прибор (модель UA-5), где с блоком управления, в который встроены и потенциометрический регистратор, может быть связан как блок регистрации УФ-поглощения (тип 6: 254, 280 нм), так и блок флуориметра (тип 7: возбуждение флуоресценции в диапазоне 310 —

390 нм, регистрация в диапазоне 430—650 нм). В новом оптическом блоке Т9 (поставка с 1982 г.) имеется возможность с помощью сменных кассет использовать, кроме ртутной, еще цинковую и кадмиевую лампы, обеспечивающие регистрацию поглощения при 214 и 229 нм. С помощью этих ламп и набора фильтров можно вырезать узкие полосы спектра еще для 12 длин волн в интервале 308—643 нм. Имеется также и портативный спектрофотометр («ISCO», модель V4) на диапазон длин волн 190—750 нм, с 10 диапазонами чувствительности в интервале 0,002—2 оптические единицы на шкалу. Аналогичный прибор производит и фирма «LKB» (модель 2151).

Флюориметры

Наибольшей популярностью пользуется малогабаритный флюориметр фирмы «Gilson» (модель 121) (рис. 39). Это более чувствительный, чем UA-5, прибор, оснащенный фотоумножителем. Источником света служит лампа с широким спектром излучения (320—800 нм). С целью избирательной регистрации флюоресценции *о*-фталевого альдегида имеются специальные фильтры для возбуждающего света и флюоресценции (360 и 455 нм); регистрацию флюоресценции обеспечивает другая пара фильтров (390 и 475 нм). Кроме них, есть еще 12 пар фильтров. Имеются сменные кюветы на 9 и 0,6 мл; последние — для работы в микромасштабе с очень тонкими колонками для ЖХВД. Надежность, чувствительность и быстродействие обеспечили флюориметру фирмы «Gilson» широкую известность — некоторые другие фирмы комплектуют им свои жидкостные хроматографы высокого давления.

КОЛЛЕКТОРЫ ФРАКЦИЙ

Для разделения всего объема элюата на фракции с целью отбора тех из них, которые содержат нужные компоненты исходной смеси веществ, широко применяют автоматические коллекторы фракций. Объем фракций задается экспериментатором или избирается самим прибором в соответствии с объемом выходящих из колонки пиков. Фракции собираются прибором в пробирки, стаканы, флаконы скintillationного счетчика или колбы. Объем каждой фракции может варьировать от долей миллилитра до десятков миллилитров, их число доходит до 300, а продолжительность сбора одной фракции может составлять минуты или часы — все это ставит перед конструкторами коллекторов непростые задачи по сочетанию вариативности рабочих параметров с компактностью и надежностью работы прибора. Последнее требование имеет особо важное значение, поскольку коллекторы работают, как правило, без наблюдения за ними (например, в ночное время), а также нередко в условиях повышенной влажности, в холодной комнате.

На рис. 40 представлены схемы наиболее распространенных вариантов прямоугольной конструкции коллектора. В первом ва-

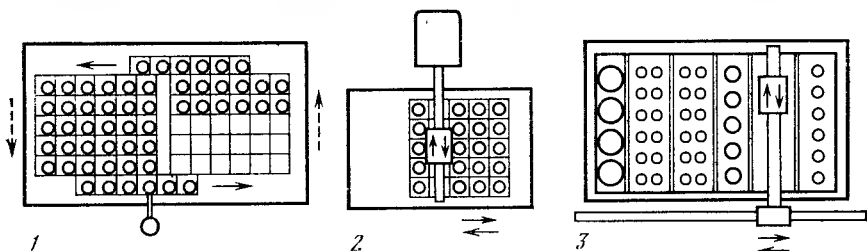
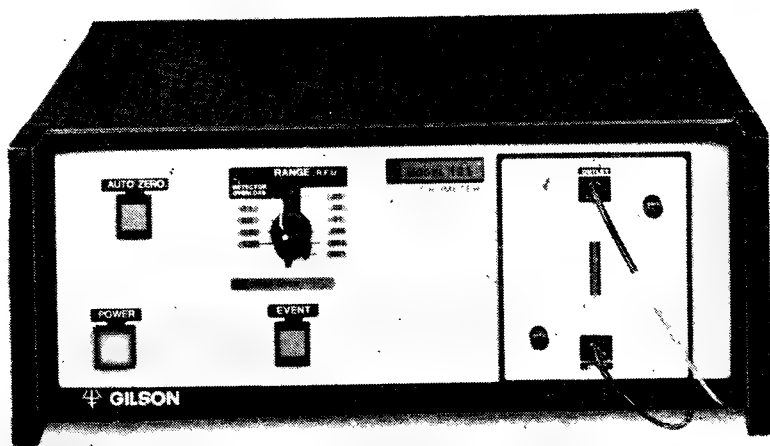


Рис. 39. Проточный флюориметр фирмы «Gilson» (модель 121)

Рис. 40. Три варианта конструкции прямоугольных коллекторов фракций

рианте капельница, которой заканчивается трубочка, идущая от колонки, остается неподвижной. Штативы с пробирками или флаконами установлены в две группы. В то время как передний штатив левой группы проходит мимо капельницы, задний штатив правой группы переходит в левую группу. По окончании сбора фракций в пробирки одного штатива обе группы целиком перемещаются в противоположных направлениях, так что первая пробирка следующего штатива левой группы оказывается под капельницей, а задний штатив правой группы выходит на исходную позицию для своего перемещения влево. Во втором варианте (малогабаритный коллектор) капельница совершает возвратно-поступательное движение вдоль траверсы, а весь блок пробирок продвигается мимо нее, подводя под капельницу следующий ряд пробирок после того, как заканчивается заполнение предыдущего ряда. В третьем варианте все пробирки или иные сосуды установлены в неподвижные (но легко съемные) штативы, капельница движется вдоль траверсы,

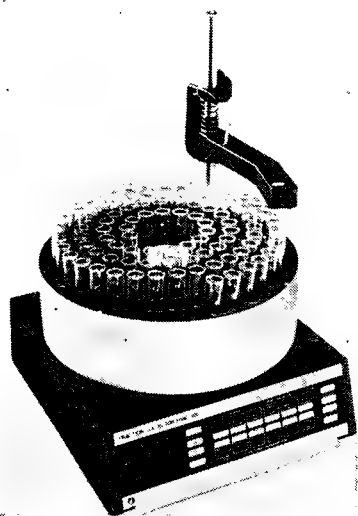


Рис. 41. Коллектор фракций «FRAC-100» фирмы «Pharmacia»

Целесообразность использования далеко идущей автоматизации (и соответствующих затрат) следует оценивать, исходя из характера и частоты постановки хроматографических экспериментов. Эта оценка далеко не всегда может оказаться в пользу коллектора с программным управлением. Вот почему многие фирмы наряду с такими коллекторами выпускают и относительно простые, надежные и дешевые модели. Любопытно отметить здесь, что вновь появились в продаже круговые коллекторы, в которых пробирки располагаются по концентрическим окружностям или по спирали, а их смена обеспечивается поворотом барабана, в который они установлены. Радиальное перемещение капельницы с окружности на окружность или постепенно вдоль спирали осуществляется за счет поворота рычага, на котором она установлена (рис. 41). Конструктивно осуществление поворотов вокруг оси всегда проще, а нередко и надежнее, чем обеспечение возвратно-поступательных движений.

Дозировка объема фракций может осуществляться различными способами. Почти вышла из употребления дозировка по суммарному объему фракции с помощью сифона (как, например, в простом коллекторе фирмы «ISCO», модель 2114). Стеклоянные сифоны хрупки и пригодны лишь для сбора относительно больших объемов. Широко распространенная дозировка путем отсчета капель с помощью фотоэлемента не отличается точностью (иногда отклонения достигают $\pm 20\%$), поскольку поверхностное натяжение жидкости и объем капли могут изменяться как в ходе элюции за счет смены

а траверса по окончании заполнения сосудов одного штатива передвигается к следующему. Этот вариант конструкции отличается наибольшей гибкостью и экономичностью размещения, так как позволяет установить в коллектор сосуды различной емкости в соответствии с ожидаемым соотношением объемов полезных фракций и «пустых» участков элюента между ними. Движениями капельницы и траверсы управляет микропроцессор по заранее заданной программе, выполнение которой корректируется самими пиками выходящего из колонки вещества с помощью сигналов от УФ-детектора.

Как всегда, расширение функций и автоматизации операций, которые иной раз может без особого труда выполнить человек, ведет к усложнению прибора, заметному росту его стоимости, а иногда — и снижению надежности работы. Це-

элюента, так и от опыта к опыту за счет колебаний температуры и давления окружающего воздуха. Дозировка путем отсчета времени с помощью установленного в коллекторе таймера опирается на постоянство скорости подачи элюента насосом. Между тем, эта скорость может изменяться в ходе хроматографического опыта за счет изменения сопротивления колонки. Наиболее совершенным является вариант импульсного управления коллектором (сменой фракций) от перистальтического насоса, исходя из фактической скорости его работы. Эту функцию могут выполнять насосы Р-1 (фирма «Pharmacia»), «Micro Perplex» («LKB»), «Minipuls Volumetric» («Gilson») и модель 1612 («ISCO»).

Некоторый минимальный уровень автоматизации, разумеется, предусмотрен даже в самой простой модели коллектора, например задание объема фракций и их числа до автоматической остановки коллектора и насоса или подача отметки на ленту регистратора после каждой смены пробирки (желательно с учетом сдвига по объему между моментом прохождения фракции через кювету детектора и ее поступлением в пробирку). Удобно, если коллектор снабжен цифровым индикатором номера фракции и объема, уже поступившего в пробирку. Во многих случаях, особенно при работе с радиоактивно меченными веществами, необходимо, чтобы в коллекторе было предусмотрено устройство, управляющее клапаном, который запирает колонку во время смены пробирок. Нелишним является оснащение прибора «памятью» на случай временного отключения напряжения в сети, с тем чтобы он мог возобновить свою работу с прерванного положения после включения тока. Все электронные управляющие устройства желательно герметизировать для обеспечения стабильной работы во влажной атмосфере.

Менее необходимо (но в случае большой загрузки оправдано) использование коллекторов с микропроцессорами и программным управлением. Такие коллекторы, например, могут отбирать только материал, выходящий в составе пиков, и сливать элюент между ними, собирать четкий одиночный пик в одну пробирку, а плохо разделившиеся пики — в несколько пробирок малого объема. Управление этими операциями происходит в зависимости от амплитуды поглощения света, которую по заданной программе оценивает специальное устройство, именуемое «Level-sensor» («Pharmacia», «LKB») или «Peak detector» («Gilson»).

С помощью системы управляемых кранов связанный с коллектором дополнительный контрольный блок (например, «FRAC-CC Chromatography controller» фирмы «Pharmacia») может осуществлять в заданном режиме промывку и уравнивание колонки, внесение препарата, смену буферов и градиентов элюции и др.

Ниже приведены краткий перечень и основные параметры наиболее употребительных коллекторов фракций.

Фирма «Pharmacia». 1. Прямоугольный коллектор (вариант 3) с программным управлением «FRAC-300» на 300 пробирок диаметром 8—12 мм, или 200 пробирок диаметром 12—18 мм, или 50 стаканчиков (флаконов) диаметром 18—38 мм, или любую их комбинацию, набираемую в 10 штативах. Отбор фрак-

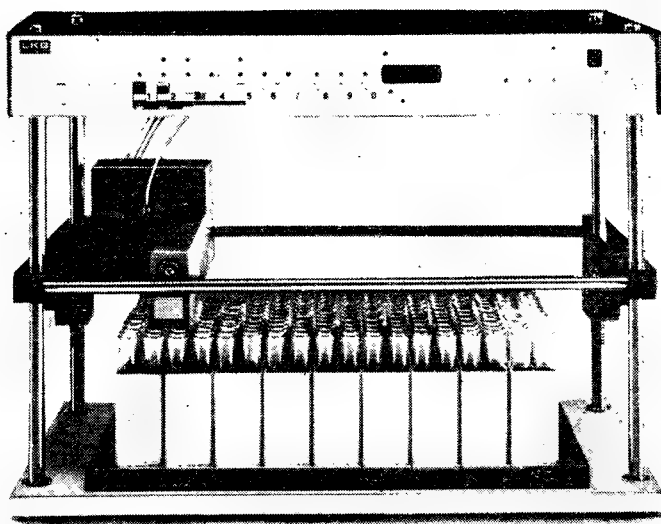


Рис. 42. Коллектор фракций «2211-SuperRac» фирмы «LKB»

ций — по времени (0,1—100 мин), по числу капель (1—1000) или под контролем перистальтического насоса P-1. Размеры $60 \times 40 \times 31$ см, вес 13 кг. Комплектация: «Level sensor FRAC-LS» и «Chromatography controller FRAC-CC».

2. Малогабаритный коллектор спирального типа «FRAC-100» на 100 пробирок, с упрощенной системой программного управления.

Фирма «LKB». 1. Прямоугольный коллектор (вариант 3) с программным управлением «2211 Super Rac» на 312 или 180 пробирок, или 84 сцинтилляционных флакона диаметром 28 мм. Отбор фракций — по времени (0,1—99,9 мин), по числу капель (1—999) или под контролем перистальтического насоса 2132 «Micro Perplex». Размеры $55 \times 33 \times 43$ см, вес 18,5 кг (рис. 42).

2. Прямоугольный коллектор (вариант 1) на 200 пробирок (в 20 штативах) «2070 Ultro Rac». Отбор фракций — как у «Super Rac». Необходимый минимум автоматизации. Надежность прибора апробирована многолетним опытом. Размеры $52 \times 33 \times 25$ см, вес 20 кг.

3. Простой неавтоматический коллектор спирального типа «2112 Redi Rac» на 100 пробирок диаметром 16 мм или 45 флаконов по 28 мм. Отбор фракций — как и в двух предыдущих моделях. Размеры $38 \times 27 \times 27$ см, вес 3,3 кг.

Фирма «ISCO». 1. Прямоугольный коллектор (вариант 3) «FOXY» с микропроцессором и разнообразными возможностями программирования и анализа пиков с помощью блока «LC Peak Separator». Съемные штативы на 144 пробирки, 72 сцинтилляционных флакона или 36 воронок для слива элюата любого объема в отдельно стоящие емкости. Отбор фракций — по времени, по числу капель или по объему (при дополнительной установке сифона, модель 405). Размеры $59 \times 22 \times 31$ см, вес 12,3 кг.

2. Прямоугольный коллектор (вариант 1) «Retriever III», аналогичный коллектору «Ultro Rac», но с более широким набором штативов, в том числе для сцинтилляционных флаконов.

3. Модель 1850 — упрощенный вариант такого же прямоугольного коллектора (без автоматизации), вмещающий до 240 пробирок.

4. Модель 1220 — миниатюрный коллектор того же типа на 114 пробирок, вес 8 кг.

5. Модель 2111 — простой коллектор кругового типа на 100 пробирок или 40 сцинтилляционных флаконов, вес 9,8 кг.

Фирма «Gilson». 1. Миниатюрный прямоугольный коллектор (вариант 2) на 80 пробирок «Microsol TDC 80». Отбор фракций — по времени, по числу капель или под контролем перистальтического насоса той же фирмы «Minipuls Volumetric». Необходимый минимум автоматизации. Прибор привлекателен своей компактностью ($35 \times 15 \times 29$ см) и простотой.

2. Два прямоугольных коллектора с неподвижными пробирками в съемных штативах, отличающиеся друг от друга по емкости и габаритам. Модель 201 в одном из нескольких вариантов штативов позволяет установить 80 пробирок размером $1,3 \times 10$ см, а модель 202—300 таких пробирок. Оба коллектора комплектуются штативами с воронками для сбора фракций неограниченного объема, а также штативами для микропробирок, сцинтилляционных флаконов и др. Гибкую программу отбора нужных фракций или пиков можно задать с помощью автономного малогабаритного программного устройства.

ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Хроматографию белков нередко необходимо вести на холоду. Использовать для этой цели холодную комнату не всегда удобно. В связи с этим уместно упомянуть специальные холодильные шкафы с прозрачными дверцами, предназначенные для установки в них всего комплекса хроматографического оборудования (кроме регистратора, который удобнее установить снаружи).

Фирма «LKB» выпускает две модели таких шкафов: «Combi Cold Rac» емкостью 830 л и «Mini Cold Lab» емкостью 525 л (площадь основания 77×77 см). Эти шкафы могут поддерживать внутри заданную температуру в пределах $0-20^\circ$ с точностью $\pm 1,5^\circ$.

Фирма «ISCO» выпускает аналогичный холодильный шкаф меньшего объема (250 л) — модель 339. Он пригоден для установки любого из коллекторов этой фирмы, а также коллектора «Ultras Rac» фирмы «LKB».

В некоторых случаях для проведения хроматографического процесса нужно не охлаждение, а термостатирование колонки при определенной положительной температуре. Для этой цели можно воспользоваться любым лабораторным термостатом с насосом или специальным термостатом фирмы «LKB» «2209 Multi Temp», который способен поддерживать температуру термостатирующей жидкости от -10° (метанол) до $+100^\circ$ с точностью $\pm 0,4^\circ$ и подавать ее в рубашку колонки со скоростью 18 л/мин.

ХРОМАТОГРАФИЯ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ

Уже упоминалось, что высокоэффективная жидкостная хроматография при высоком давлении (ЖХВД) получила очень широкое распространение главным образом в качестве экспресс-метода технологического контроля производства низкомолекулярных природных (и не природных) соединений. В исследованиях белков и нуклеиновых кислот ЖХВД играет пока более скромную, но заметную роль (фракционирование пептидов, идентификация аминокислот при секвенировании белков и др.). Далее мы увидим, что для исследо-

вания биологических макромолекул, по-видимому, наибольший интерес представляет развитие жидкостной хроматографии при умеренных давлениях (до 30 атм). Тем не менее, в последующих главах мы постараемся осветить относящиеся к нашей теме достижения ЖХВД, а здесь бегло познакомимся с соответствующей хроматографической техникой. Она отличается своеобразием, вытекающим из двух главных особенностей ЖХВД: хроматографическая элюция идет под давлением, достигающим 400 атм и более, а весь хроматографический процесс укладывается в интервал времени 10—30 мин.

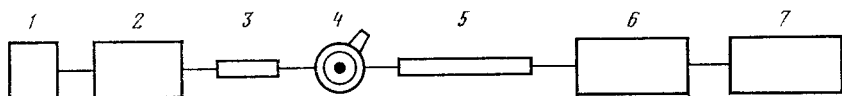


Рис. 43. Блок-схема элементов системы хроматографии при высоком давлении (ЖХВД)

1 — резервуар с элюентом; 2 — насос; 3 — предколонка; 4 — инжектор; 5 — колонка; 6 — детектор; 7 — регистратор

То и другое связано с использованием гранул со средними размерами 10, 5 и даже 3 мкм, что позволяет получить очень хорошее разделение при большой скорости элюции (см. гл. 1), а высокое давление необходимо для того, чтобы обеспечить такую скорость в условиях повышенного сопротивления мелких, плотно упакованных гранул.

На рис. 43, где представлена простейшая блок-схема элементов системы ЖХВД, в одном ряду с новыми элементами (предколонка, инжектор) стоят и уже знакомые хроматографические приборы, к которым, однако, предъявляются совсем иные требования, и поэтому здесь можно ожидать появления новых конструктивных решений. Особенно это относится к насосу, который должен не только создавать давление в несколько сот атмосфер, но и работать без пульсаций, недопустимых ввиду малой длительности выхода отдельных хроматографических пиков (иной раз — несколько секунд). Помимо высокой чувствительности, детектор и регистратор должны отличаться быстродействием, достаточным для того, чтобы регистрировать форму таких пиков без искажений. Кювета детектора находится уже при низком давлении, за колонкой, но в случае засорения давление в ней может увеличиться. Колонки и трубопроводы выполняются из нержавеющей стали, их соединения и уплотнения должны быть рассчитаны на высокое давление. Система не имеет запорных кранов, так как при остановке насоса из-за колоссального гидравлического сопротивления колонки течение жидкости прекращается. Особые меры предосторожности принимают для защиты дорогостоящей колонки от засорения микро-частицами: перед колонкой устанавливают стальной фильтр с порами диаметром 2 мкм и короткую сменную предколонку, второе назначение которой состоит в том, чтобы уменьшить растворение силикагеля в основной колонке (раствор элюента насыщается сили-

кагелем в предколонке, и это сдвигает равновесие растворения в рабочей колонке). Наконец, инжектор обеспечивает возможность внесения препарата в колонку «на ходу» — без снижения давления. Рассмотрим теперь конструктивные особенности элементов системы и приведем некоторые справочные данные.

КОЛОНКИ

На рис. 44 изображена колонка для ЖХВД, а также крупным планом и в разрезе показано уплотнение ее конца и подходящего к нему трубопровода. Аналогичная система монтируется и на втором конце колонки. Из рисунка видно, что уплотнение конца колонки и трубопровода осуществляется путем сжатия мощными стальными гайками конических прокладок из тефлона, иногда со специальным керамическим наполнителем. Аналогично осуществляется уплотнение соединений трубопроводов между собой, разного рода тройников и др. Разнообразные стандартные конструкции таких соединений производит фирма «Swagelok Fittings».

Рабочие размеры колонок для ЖХВД более или менее стандартизированы. Чаще всего используют колонки длиной 15, 25 и 30 см, хотя выпускаются и более длинные колонки — до 1,5 м. Набор внутренних диаметров тоже невелик: 2,1; 3,9; 4,6; 6,2; 7,8 и 9,4 мм; особенно «популярны» диаметры 3,9 и 4,6 мм. Правда, встречаются и диаметры 1,5; 2; 2,5; 4; 4,5; 6,5 и 10 мм. Колонки диаметром 7,8 мм и более в ЖХВД рассматриваются как препаративные. Предколонки тех же диаметров имеют длину 4—7 см.

Все чаще возникающая в последнее время необходимость фракционирования микроколичеств исходных препаратов, а также развитие высокочувствительных методов детектирования, с одной стороны, и стремление к экономии дорогостоящих элюентов для ЖХВД, с другой, привели к тому, что ведущие фирмы стали выпускать системы для хроматографии в микромасштабе. Такова, например, « μ LC System» фирмы «Beckman». В ее состав входит колонка типа «Ultrasphere ODS» диаметром 2 мм и длиной 25 см. Для работы с ней стандартное оборудование этой фирмы комплектуется дополнительными деталями: микрокюветой на 5 мкл для УФ-детектора (модель 160) и петель препарата такого же объема. Фирма «LKB» в своей новой «Microbore HPLC System» предлагает две колонки «Ultropac» RP8 и RP18 диаметром 1 мм при длине 25 см. Скорости элюции для таких колонок снижаются до 10—150 мкл/мин при сохранении обычного для ЖХВД времени разделения (5—20 мин). С этим связано 10—20-кратное снижение расхода элюента. Стандартный насос «LKB 2150 HPLC Pump» обеспечивает работу на указанных скоростях. УФ-детектор с переменной длиной волны (типа «LKB 2151») комплектуется микрокюветой объемом 0,8 мкл с длиной оптического пути 3 мм; инжектору придаются петли препарата на объемы 0,5, 1,2 и 5 мкл.

Пустые колонки поставляют фирмы «Bio-Rad», «Pierce», «Rainin» и др. Набивку колонок микрогранулярным сорбентом для ЖХВД

производят обычно из разбавленной суспензии под большим давлением с помощью специальных устройств. В лабораторных условиях выполнить эту операцию на уровне фирменных стандартов достаточно трудно, и подавляющее большинство исследователей предпочитает использовать готовые колонки, тем более что нормальный срок службы одной колонки составляет около года.

Разнообразие имеющихся в продаже типов готовых колонок для ЖХВД соответствует отмеченному выше разнообразию модифици-

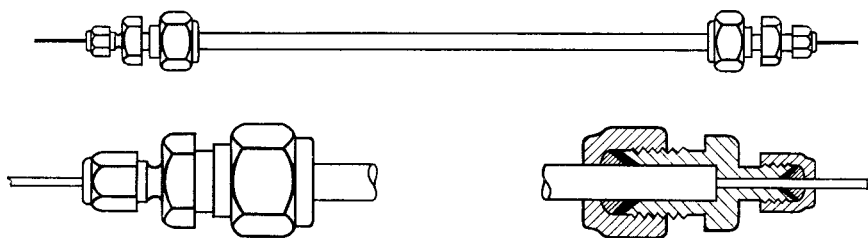


Рис. 44. Колонка для ЖХВД

рованных сорбентов на основе силикагеля, выпускаемых разными фирмами. Основную продукцию этих фирм составляют именно готовые колонки, а не сами сорбенты. Здесь нет смысла перечислять наименования и параметры колонок для ЖХВД — читатель их найдет в каталогах фирм, названных в гл. 2. Как правило, колонки именуются по заполняющему их сорбенту. Из крупных фирм только «Merck» перед названием сорбента вводит еще и общее наименование «Hibar», что означает колонку высокого давления (в отличие от колонок низкого давления «Lobar»).

Отметим также некоторые относительно новые идеи в конструировании колонок и соответствующие необычные наименования.

Фирма «Brownlee Labs» пропагандирует выпускаемые ею под названием «MPLC Catridges» укороченные колонки (4,6 мм × 10 см) и предколонки того же диаметра длиной 3 см, набитые тем же самым сорбентом (различно модифицированные — «Spheri 5» и «Lichrosorb»). Эти колонки и предколонки можно вручную свинчивать в специальных патронах, собирая тем самым колонки большей длины. По данным фирмы, на колонке длиной 10 см, уменьшив вдвое скорость элюции, при вдвое меньшем давлении можно получить столь же хорошее разрешение, как и на обычной колонке длиной 25 см.

Фирма «Waters» под названием «Radial-PAK Catridges» предлагает колонки для ЖХВД диаметром 5 или 8 мм и длиной 10 см, изготовленные из... полиэтилена. Перед использованием такую колонку зажимают в стальной патрон с защелками кулачкового типа («Z-Module» или RCM-100). Колонки заполнены одним из сорбентов той же или другой фирмы, например «Partisil SAX» или «SCX» (см. табл. 2).

ВНЕСЕНИЕ ПРЕПАРАТА

Хорошо очищенный раствор препарата на аналитическую колонку для ЖХВД вносят обычно в количестве нескольких микролитров или десятков микролитров, не снижая высокого давления жидкости. Прежде чем описать устройство упомянутого выше инжектора, остановимся на другом варианте внесения раствора препарата — с помощью шприца Гамильтона путем прокалывания специальной прокладки («septum»). На рис. 45 изображен наконечник колонки, предназначенный для этой операции. Элюент от насоса подается через боковой отросток, а сверху через две прокладки, зажатые стальными шайбами с направляющими отверстиями посередине, войдет игла шприца. Благодаря малому диаметру поршня шприца Гамильтона нажатием пальца можно обеспечить необходимое давление в сотни атмосфер. После удаления иглы отверстие в прокладке герметически закрывается. Для этого прокладки изготавливают из силиконовой или неопреновой резины, усиленной нейлоном, и покрывают с обеих сторон тефлоном.

Конструкция шприца Гамильтона показана на рис. 46. Поршнем служит стальная проволока с тефлоновым наконечником, перемещающаяся в калиброванной толстостенной стеклянной трубке. На конце трубки прочно фиксирована игла длиной 5 см (наружный диаметр — 0,7 мм, внутренний — 0,12 мм). Выпускаются шприцы, рассчитанные на различные фиксированные микрообъемы. Широко используются шприцы марок LC-210 и -800 (фирма «Precision Sampling Co»).

Схема наиболее распространенного варианта инжектора представлена на рис. 47. Наружное кольцо статора имеет шесть равномерно расположенных по его окружности отверстий, к которым через соответствующие переходники постоянно подключены трубопроводы, идущие от насоса и к колонке (выводы 2 и 3), и калиброванная по объему сменная стальная «петля», которую заполняет препарат (выводы 1 и 4). В центральном вращающемся барабане имеются три канала. Заполнение петли производится в положении А из шприца через вывод 6 при атмосферном давлении. Излишек препарата через вывод 5 сливается. В этом же положении перед внесением препарата производится промывка петли буфером. В это время элюент от насоса под высоким давлением поступает на колонку. Затем барабан поворачивают вручную на строго фиксированный угол 60° (положение В). Теперь петля с препаратом оказывается включенной в тракт высокого давления — элюент от насоса выдавливает раствор препарата и направляет его в колонку. В петлю, предварительно заполненную элюентом, можно вносить препарат и в меньшем, чем объем петли, количестве. Гнездо для иглы шприца размещается в корпусе выведенной на панель прибора рукоятки поворота барабана инжектора. Такая конструкция используется в инжекторе «Rheodyne 7010» с петлей на 20 мкл, которым оснащено большинство современных хроматографов высокого давления. Фирма «Rheodyne» сейчас поставляет и микроинжекторы

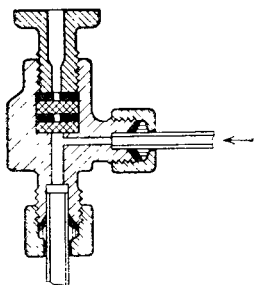


Рис. 45



Рис. 46

Рис. 45. Наконечник колонки высокого давления, предназначенный для введения препарата путем непосредственного впрыскивания его в ток элюента с помощью шприца Гамильтона

Рис. 46. Шприц Гамильтона

Рис. 47. Схема инжектора препарата

А — положение ротора при заполнении петли раствором препарата; Б — положение ротора при внесении препарата на колонку

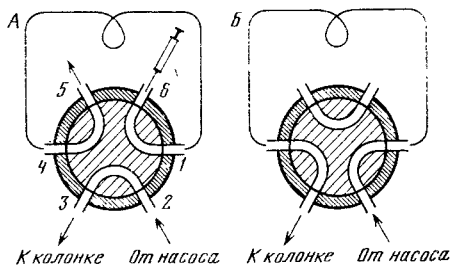


Рис. 47

(модели 7410 и 7413), оснащенные взаимозаменяемыми петлями препарата объемом 0,5, 1,2 и 5 мкл. В модели 7413 можно установить сразу три петли и сменять их простым поворотом диска, несущего эти петли. Имеется и вариант инжектора с четырьмя выводами и поворотом барабана на 90° («Beckman-Altex», модель 210), работающего на том же принципе.

В конструкции своего инжектора типа «UGK» фирма «Waters» отказалась от поворотного барабана (из-за возможности его подтекания после некоторого износа) и ввела вместо этого два отдельных (сдвоенных) крана. Манипулируя последними, можно сначала заполнить при атмосферном давлении петлю препарата, а затем подключить ее к току элюента параллельно с относительно высоким гидравлическим сопротивлением. При этом 99% элюента проходит через петлю и уносит препарат в колонку. По окончании операции петлю можно перекрыть, и тогда весь ток элюента снова пойдет через гидравлическое сопротивление.

НАСОСЫ

Как уже упоминалось, насосы — наиболее ответственная часть хроматографа, поэтому не удивительно, что имеется несколько вариантов не только конструкции, но и принципа работы этих приборов и они неустанно совершенствуются в ходе конкуренции разрабатывающих их фирм. Заметим, впрочем, что с позиций пер-

спектив хроматографии биополимеров на эту «гонку изобретательности» можно смотреть довольно равнодушно, ибо, как уже подчеркивалось, эти перспективы предъявляют куда более скромные требования как к уровню необходимого давления, так и к допустимой степени его пульсации. Тем не менее, познакомиться с основными развиваемыми здесь идеями, по-видимому, имеет смысл.

Несмотря на отмеченное разнообразие конструкций, большинству из них присущи некоторые общие черты. Необходимость обеспечения высокого давления заставляет использовать главным образом насосы плунжерного типа (правда, есть и мембранные). Возвратно-поступательное движение плунжеру задает вращение эксцентричного «кулачка». Чередование циклов всасывания и нагнетания жидкости обеспечивается работой шариковых клапанов. Плунжеры и клапаны изготавливают из сапфира или рубина. Схема насоса такого типа (рис. 48) не требует пояснений. По этой простой схеме работает очень популярный и надежный насос «Milton Roy Minipump». Три модели этого насоса (396-31, 396-57 и 396-89) предназначены для обеспечения расходов жидкости в диапазонах 16—160, 29—290 и 46—460 мл/ч соответственно. Регулирование подачи в указанных диапазонах можно производить в процессе работы насоса с помощью микрометрического винта. Такой насос может развивать давление до 500 атм. Ясно, что на его выходе неизбежны значительные пульсации давления.

Для снижения уровня пульсаций фирма «Du-Pont» в своих хроматографах устанавливает параллельно три насоса плунжерного типа, работающих со сдвигом по фазе на 120° друг относительно друга. Уровень расхода жидкости (0,1—10 мл/мин) регулируется изменением скорости вращения электромотора, которую определяет частота следования импульсов от электронного задатчика скорости.

Фирма «Beckman» («Altex») идет по пути ускорения движения плунжера на фазах всасывания и предварительного сжатия, что достигается заданием определенной частоты следования импульсов, управляющих электромотором. Имеется возможность независимой регулировки скорости всасывания (из-за опасности кавитации) и скорости предварительного сжатия (в зависимости от степени сжимаемости органического растворителя). Аналогичный принцип подавления пульсаций используют фирмы «Varian» и «Gilson».

В популярном насосе фирмы «Waters» (модель 6000 A) используется демпфирующая система с двумя цилиндрами. В то время как плунжер основного цилиндра подает жидкость на колонку, часть ее запасается во вспомогательном цилиндре. Эта часть жидкости продолжает питать колонку в течение времени, необходимого для всасывания новой порции жидкости в основной цилиндр. По тому же принципу работает насос в хроматографе фирмы «Spectra Physics».

Новая модель насоса (590) фирмы «Waters» в соответствии с запросами времени снабжена программным устройством с широкими возможностями автоматизации и запоминания режимов работы; кро-

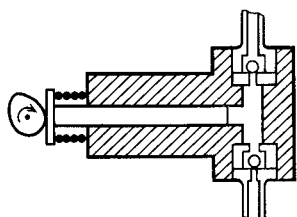


Рис. 48. Схема простейшего насоса плунжерного типа

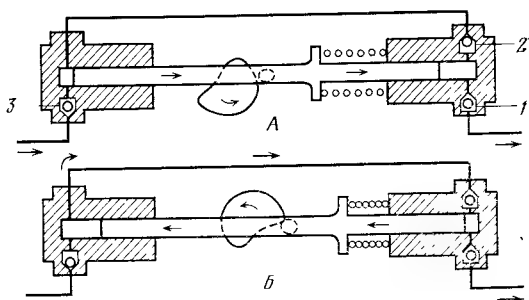


Рис. 49. Принцип работы насоса ВТ3020 фирмы «Biotronik» (см. текст)

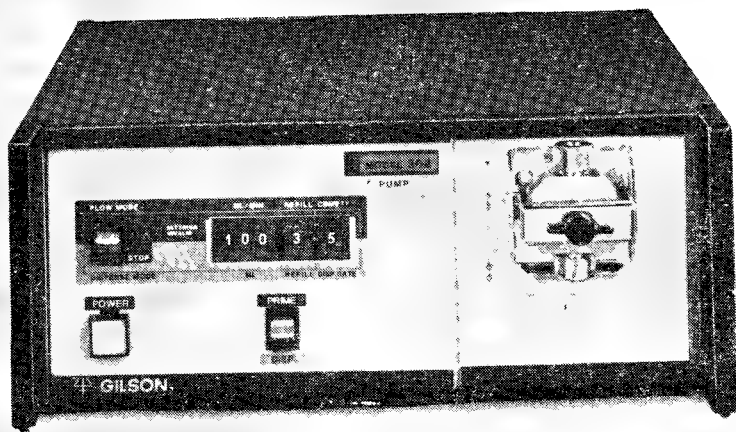


Рис. 50. Насос для ЖХВД фирмы «Gilson» (модель 302)

ме того, здесь существенно снижена минимальная скорость подачи элюента (с 0,1 до 0,001 мл/мин), что позволяет использовать эту модель для работы с колонками диаметром 1 мм и меньше.

Оригинальное решение задачи снижения уровня пульсации найдено фирмой «Biotronik» (рис. 49). Движением общего для двух головок плунжера управляет кулачок сложного профиля, на котором длинный участок постепенного увеличения радиуса сменяется участком быстрого его уменьшения. В положении А плунжер под давлением кулачка медленно движется вправо. Жидкость из правой головки поступает в колонку. Клапан 2 закрыт, а клапан 1 открыт. В левую головку жидкость всасывается. Ниже (Б) изображен момент, когда плунжер быстро идет влево. Клапан 1 под давлением жидкости закрывается, а клапан 2 открывается. Жидкость

быстро перебрасывается из левой головки в правую (и одновременно продолжает поступать в колонку). Затем возобновляется медленная часть цикла подачи жидкости. Общий расход жидкости (0,1—10 мл/мин) регулируется изменением скорости вращения кулачка. Дополнительное достоинство системы состоит в том, что она «не боится» попадания пузырьков воздуха в насос со стороны всасывания (кавитации): при сжатии жидкости в левой головке пузырьки исчезают.

В Чехословакии выпускается плунжерный насос высокого давления VCM-300.

По-видимому, наиболее совершенна сейчас конструкция насоса фирмы «Gilson» (модель 302) (рис. 50). В систему привода введено свободное сочленение плоскостей поступательно перемещающейся траверсы (ее положение задается профилем кулачка) и хвостовика плунжера насоса, который прижимает к траверсе мощная пружина. Благодаря этому исчезает трудная проблема обеспечения строгой соосности привода и плунжера, резко уменьшается износ последнего, а главное — появляется возможность легкой (в течение нескольких секунд) и не требующей специального навыка смены рабочих головок. Набор из пяти сменных головок позволяет с сохранением высокой точности подачи перекрыть очень широкий ее диапазон: от 5 мкл/мин до 100 мл/мин. Так же просто и удачно, с использованием сжимаемой жидкости, решена задача демпфирования остаточных пульсаций после их предварительной электронной корректировки. Рациональная простота конструкции позволила существенно снизить стоимость насоса. Его продажная цена примерно вдвое меньше, чем названных выше насосов других фирм.

ЗАДАНИЕ ГРАДИЕНТА ЭЛЮЦИИ

В большинстве случаев при ЖХВД используют изократическую элюцию. В качестве резервуара для элюента служит обычная колба или бутыл, куда заливают тщательно очищенный и дегазированный буфер. Ступенчатый градиент осуществляется последовательным подключением на вход насоса нескольких бутылей с помощью многоходового крана. Управление краном по заданной программе можно поручить командному устройству, если таковое имеется в хроматографе, или производить вручную по секундомеру. В хроматографах последних выпусков предусматривается возможность задания непрерывного градиента. Для этого используются не сообщающиеся сосуды, а одновременная подача элюента в смеситель от двух или даже трех (модель 5000 фирмы «Varian») насосов. Соотношение скоростей работы этих насосов определяет форму градиента; оно изменяется по заданной программе под контролем микропроцессора или специального задатчика градиента. Смешивать растворы, образующие градиент, можно и на стороне низкого давления, т. е. на входе насоса. В этом случае можно обойтись одним насосом и системой двух попеременно работающих клапанов, по-

добно тому как это делается в задатчиках градиента произвольной формы для хроматографии низкого давления (типа «Ultragrad» или «Mihograd»; см. выше). Однако гораздо надежнее вести образование градиента с помощью двух насосов и смешивать его компоненты на стороне высокого давления. В этом случае можно точнее осуществить форму градиента, поскольку оба насоса работают непрерывно и объем смесителя может быть малым; кроме того, устраняется опасность кавитаций и образования пузырей газа в смесителе на входе насоса. Наконец, надежная система двух быстродействующих управляемых клапанов, вероятно, стоила бы не меньше, чем второй насос, поэтому в современных хроматографах используется принцип смешивания градиента на стороне высокого давления.

Программное устройство фирмы «Waters» (модель 660) предусматривает возможность задания любого из 11 фиксированных профилей градиента (линейного, двух ступенчатых и по четыре — выпуклых и вогнутых). Экспериментатору достаточно задать начальный и конечный состав смеси буферов, суммарную скорость подачи элюента и время элюции. Существуют варианты и более сложных систем. Например, в хроматографе фирмы «Pye Unicam» (модель PU 4800) задание формы градиента с помощью микропроцессора можно осуществить путем разбиения всего времени элюции на девять произвольных интервалов, внутри каждого из которых любую кривую можно аппроксимировать экспоненциальной функцией. Однако необходимость столь сложных (и дорогостоящих) устройств представляется сомнительной, по крайней мере для решения тех задач, которым посвящена эта книга.

ДЕТЕКТОРЫ

Детекторы, которыми оснащаются современные жидкостные хроматографы высокого давления, ничем другим, кроме быстродействия, не отличаются от рассмотренных выше устройств для обычной хроматографии. УФ-детекторы, как правило, работают по двухлучевой схеме. Примерно 10 диапазонов чувствительности перекрывают интервал от 0,002 до двух оптических единиц на шкалу. Источником света обычно служит ртутная лампа. Набор длин волн, перекрывающих ультрафиолетовую (от 254 нм) и видимую части спектра, задается сменными светофильтрами. Иногда устанавливают цинковую и кадмиевую лампы; тогда в этот набор входят также длины волн 214 и 229 нм (модель 441 фирмы «Waters», модель 160 фирмы «Beckman»). Некоторые детекторы оснащаются дополнительными приспособлениями, позволяющими вести регистрацию одновременно на двух длинах волн (с двухканальным регистратором) или записывать поглощение на одной длине волны и отношение поглощений на этой и другой длине волны, например A_{254} и A_{280} . Все ведущие фирмы, выпускающие жидкостные хроматографы высокого давления («Waters», «Beckman», «Gilson», «DuPont», «Varian», «Spectra Physics», «Pye Unicam», «Laboratory Data

Control», «Tracor»), дополнительно комплектуют свои приборы быстродействующими спектрофотометрами с широким диапазоном длин волн (190—600 нм) и высокой чувствительностью (например, модель 480 «Lambda-Max» фирмы «Waters» — до 0,001 оптической единицы на шкалу), а также флуоресцентными детекторами. Более подробные данные о целом ряде УФ-детекторов, спектрофотометров и флуориметров были приведены выше.

Недавно фирмы «Beckman» и «LKB» сообщили о выпуске детекторов, осуществляющих регистрацию УФ-спектра поглощения материала, выходящего в хроматографическом пике, «на ходу» — без прерывания элюции колонки (с целью идентификации вещества). Спектр фиксируется в запоминающем устройстве за доли секунды и сразу же может быть записан с помощью дополнительного регистратора. В детекторе модели 165 фирмы «Beckman» использован принцип быстрых колебаний дифракционной решетки, подвешенной в магнитном поле. В приборе «Rapid Spectral Detector» (модель 2140 фирмы «LKB») спектр поглощения элюента непрерывно проецируется на 256 фотодиодов, расположенных по всей длине спектра. Изменения сопротивлений фотодиодов регистрируются и обрабатываются компьютером.

Имеется возможность, например, по окончании хроматографического процесса получить на дисплее или на ленте самописца в изометрической проекции «трехмерную» картину элюции в координатах оптической плотности, времени и длины волны. Более подробные сведения об устройстве и перспективах использования таких детекторов для целей хроматографии можно найти в обзорной статье [Fell et al. — J. Chromatogr., 1983, 273, p. 3—17]. При исследовании белков и нуклеиновых кислот с их простыми, лишенными индивидуальных особенностей УФ-спектрами поглощения особой нужды в этих сложных и дорогостоящих приборах, по-видимому, нет.

Некоторые фирмы комплектуют свои приборы электрохимическими детекторами и детекторами коэффициента преломления. Здесь нет смысла приводить полный список наименований имеющихся на рынке детекторов, тем более что он непрерывно изменяется. Читатель сможет найти эти наименования и технические характеристики в фирменных каталогах.

АВТОМАТИЗАЦИЯ

Мы перечислили и кратко охарактеризовали основные узлы и приборы, входящие в комплект жидкостного хроматографа высокого давления. Кроме того, современные дорогостоящие приборы оснащаются дополнительными устройствами для автоматизации процесса, задания и хранения в памяти его параметров, обработки полученной информации. К ним относятся разного рода контрольные устройства и микропроцессоры, иногда с возможностью диалога с компьютером, интеграторы-регистраторы, нередко с дисплеем, автоматы для введения многочисленных проб с возможностью их индивидуальной обработки по различным программам. Микропроцессоры позволяют

с помощью клавиатуры вводить в память прибора несколько десятков программ, включающих в себя все параметры, хроматографического процесса: объем препарата, последовательные этапы его градиентной элюции, режимы работы насосов, условия детектирования и регистрации пиков, характер обработки результатов, способ промывки колонки и подготовки ее к следующему фракционированию. Интеграторы записывают пики, подсчитывают их площади, внося коррекцию на дрейф нулевой линии, отдельно обсчитывают «плечи» и неразделившиеся пики, отбрасывая всплески шумов или ложные пики от воздушных пузырей. На ленте самописца и на экране дисплея не только регистрируются сами пики, но и изображается форма градиента, указываются площадь и время задержки каждого пика, отмечаются все условия эксперимента и даже имя экспериментатора. Компьютеру может быть задана даже такая дополнительная задача, как линеаризация калибровочной кривой при гель-фильтрации и подсчет молекулярной массы исследуемого вещества. Автоматы для введения проб на 50—100 образцов по заданной программе отбирают нужные объемы растворов из закрытых флаконов (прокалывая пробки) и вводят их в инжектор.

Вся эта современная техника производит внушительное впечатление и, возможно, необходима для массированных контрольных анализов в промышленном производстве или крупных клиниках. Нам же представляется, что в условиях исследовательской лаборатории степень автоматизации (и расходы на ее осуществление) следует разумно ограничить. К счастью, многие фирмы («Waters», «Beckman», «Gilson» и др.) комплектуют свои приборы из отдельных блоков, в том числе и простых блоков управления, и тем самым предоставляют исследователю самому выбрать рациональную степень автоматизации своей работы. Подробности такой комплектации читатель найдет в каталогах перечисленных выше фирм.

Наиболее удобной для исследовательских целей представляется модульная система фирмы «Gilson» (Франция). Комплектующие ее малогабаритные блоки позволяют осуществить широкий набор комбинаций: от простейшей аналитической системы для изократической элюции (насос, рассчитанный на скорости подачи от 5 мкл/мин до 10 мл/мин, инжектор, УФ-регистратор с фиксированными длинами волн и самописец — рис. 51) до автоматизированной системы градиентной элюции с двумя насосами, УФ-детектором с переменной длиной волны, флюориметром, интегратором-регистратором и программным устройством, в котором использован малогабаритный компьютер с дисплеем общего назначения типа «Apple II». Его, кстати, можно использовать и для других лабораторных целей (рис. 52). Имеются и соответствующие препаративные варианты с надежными и малогабаритными коллекторами фракций. Разработчики фирмы «Gilson» сумели создать тщательно продуманные, а потому относительно простые и надежные конструкции, отвечающие, тем не менее, самым высоким требованиям. Благодаря этому стоимость хроматографических комплектов фирмы «Gilson» примерно вдвое ниже, чем аналогичных изделий других фирм.

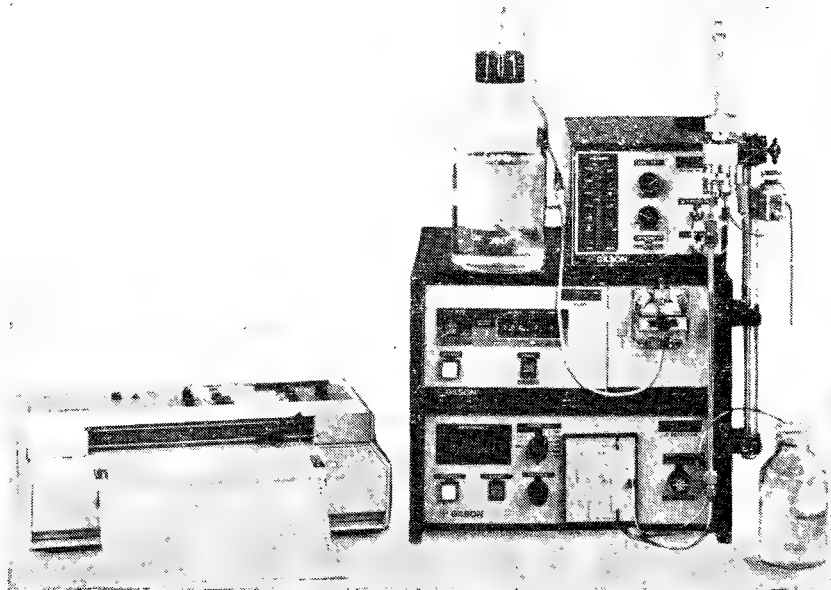


Рис. 51. Простейший набор модулей для ЖХВД фирмы «Gilson»

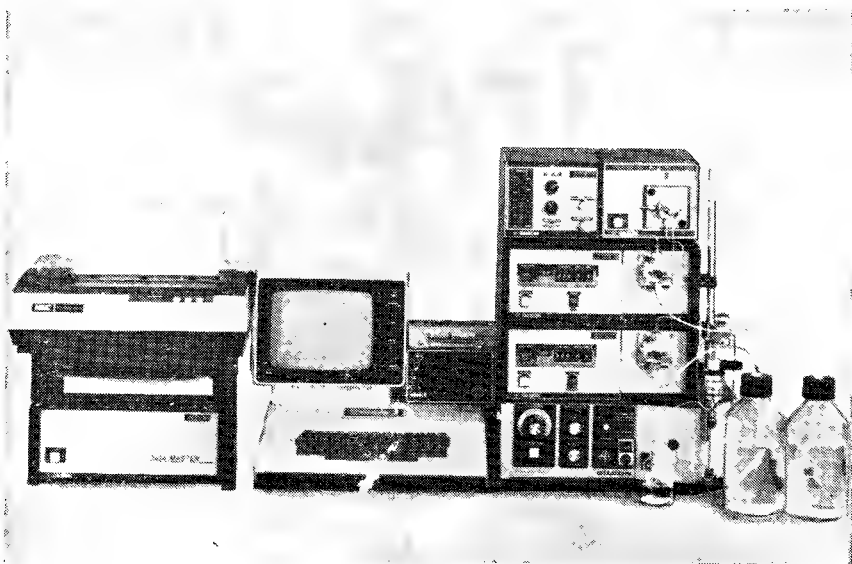


Рис. 52. Автоматизированная система градиентной элюции для ЖХВД фирмы «Gilson»

Для исследования белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов большой интерес представляют принципиально новые подходы к осуществлению высокоэффективной хроматографии, развиваемые фирмами «LKB» и «Pharmacia». По аналогии с предыдущим эти подходы можно условно объединить названием «жидкостная хроматография при умеренном давлении». Рассмотрим отличительные особенности и технические аспекты такой хроматографии.

ХРОМАТОГРАФИЯ ПРИ УМЕРЕННОМ ДАВЛЕНИИ

Если исходить из целесообразности разработки на базе ЖХВД новой стратегии для хроматографии биополимеров, то в ее основу, по-видимому, можно заложить следующие предпосылки.

1. Необходимо использовать сферические сорбенты с диаметром гранул порядка 10 мкм при минимальном разбросе значений диаметра.

2. Сорбенты должны быть крупнопористыми, с тем чтобы максимально облегчить диффузию макромолекул внутрь гранул, и все же достаточно жесткими.

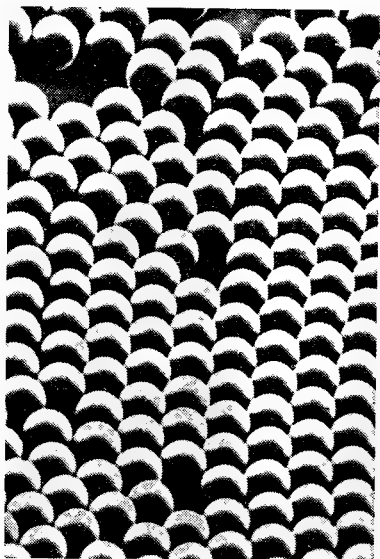
3. Хотя сохранение относительно высокой скорости фракционирования в случае лабильных белков желательно, в лабораторной практике можно согласиться с тем, что хроматография длится несколько часов.

4. В связи с этим можно ограничиться использованием умеренных давлений (30—50 атм) и допустить более высокий, чем при ЖХВД, уровень пульсаций.

5. Следует ориентироваться на хроматографию в водно-солевых средах и в связи с этим по возможности заменять сталь (из-за опасности коррозии) другими, более стойкими материалами.

Фирма «LKB» первой вступила на этот путь. В 1982 г. она начала производить несколько типов стальных колонок, заполненных сорбентами с диаметром гранул 10 ± 2 мкм, под общим наименованием «голубые колонки» («LKB Blue Columns»). Название «голубые» говорит лишь о наружной окраске, позволяющей отличать их с первого взгляда. Сначала появились колонки серии 2135 для гель-фильтрации (типа «Ultrapak TSK») с тремя различными размерами пор, немного позднее — колонки серии 2133 для ионообменной хроматографии типов «TSK 535 CM» (катионообменники) и «TSK 545 DEAE» (анионообменники). Аналитические колонки каждого типа имеют диаметр 7,5 мм, препаративные — 21,5 мм. Подробнее характеристики таких колонок рассмотрены в последующих главах; здесь же отметим, что их применение позволило получить (по рекламным данным) значительный выигрыш в разрешающей способности, особенно при гель-фильтрации белков. Скорости элюции при этом были значительно ниже, чем при ЖХВД (от 1,2 до 14 мл/см²·ч). Данных о давлении фирма не приводит, но подчеркивает, что для фракционирования биополимеров удобно использовать новый насос плунжерного типа той же фирмы («LKB 2150 HPLC pump»), оснащенный го-

Рис. 53. Микрофотография нового сорбента типа «Monobeads» фирмы «Pharmacia»



ловкой с керамическим покрытием и развивающий давление до 100 атм (со сменной стальной головкой — до 350 атм). Защита от коррозии в водно-солевой среде путем использования керамических покрытий рабочих частей насоса — довольно смелое решение, но здесь, как и во всяком новом подходе, не следует торопиться с выводами до того, как будут получены надежные данные по длительной эксплуатации насоса. В литературе появились сведения об успешном использовании новых колонок фирмы «LKB» для фракционирования белков при низких давлениях (в сочетании с перистальтическим насосом «Microperplex» той же фирмы). Такое фракционирование занимает несколько часов, но качество его заметно выше, чем при обычной хроматографии на сорбентах с более крупными гранулами.

Фирма «Pharmacia» со своей новой системой, названной «FPLC» («Fast Protein Liquid Chromatography»), только вступает на рынок биохимической аппаратуры, но, судя по представленным фирмой экспериментальным данным, ей удалось сделать весьма большой шаг вперед (подробнее — см. гл. 7). В названии новой хроматографической системы фигурирует слово «быстрая», а это находится в видимом противоречии с одной из сформулированных выше предпосылок. Впрочем, уже было отмечено, что высокая скорость хроматографического процесса остается желательной, хотя ею и можно поступиться. Если фирме «Pharmacia» удалось обойтись без этой уступки, то дело, видимо, в том, что ее специалисты сумели создать совершенно новый тип сорбента (пока что — только для ионообменной хроматографии) с уникальными свойствами. Сорбенту присвоено общее название «Monobeads». Детали его строения и химической природы пока неизвестны, но некоторые опубликованные фирмой данные оставляют большое впечатление. В первую очередь, это относится к такому важнейшему параметру, как однородность размеров гранул; от нее сильно зависит разрешающая способность любой колонки. Из рис. 53 видно, что на глаз невозможно обнаружить какой-либо вариации диаметров гранул нового сорбента (напомним, что для своих новых сорбентов фирма «LKB» указывает вариацию $\pm 20\%$). Специалисты фирмы «Pharmacia» утверждают, что диаметры гранул их новых ионообменников укладываются в интервал $10 \pm 0,1$ мкм (вариация $\pm 1\%$). То обстоятельство, что в новой хроматографической системе удастся весьма успешно фракционировать белки за 5—20 мин, позво-

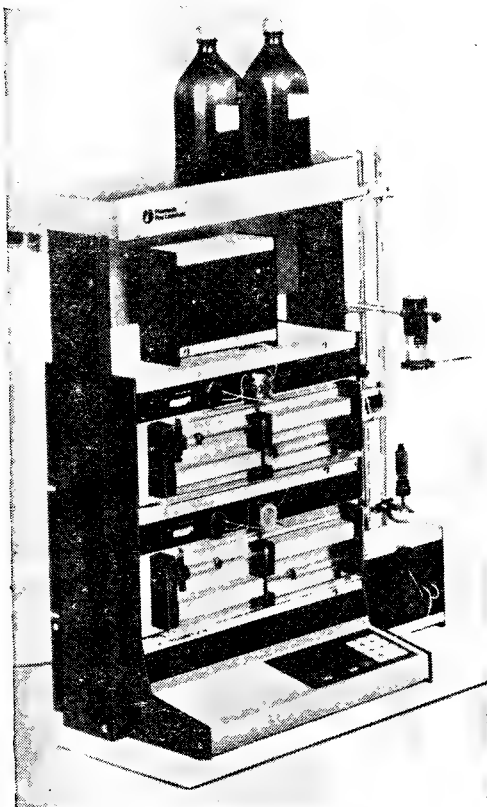


Рис. 54. Комплект приборов системы «FPLC» для хроматографии при умеренном давлении (фирма «Pharmacia»)

ляет предположить, что сорбент должен быть очень крупнопористым, а то, что его емкость в несколько раз выше, чем у DEAE-сефарозы CL-6B, свидетельствует о равномерном распределении ионогенных групп по объему гранул.

Из всего комплекта приборов для «FPLC» (рис. 54) нам знаком только двухлучевой УФ-детектор типа UV-1. В средней части стойки расположены два насоса нового типа — «Pump P-500». Это — насосы плунжерного типа (рис. 55), рассчитанные на создание давления до 40 атм; тем не менее, их рабочие цилиндры выполнены из боросиликатного стекла (смелое, но апробированное решение проблемы коррозии). Изготовленные из титана плунжеры уплотнены усиленным фторопластом. Никакие другие материалы не контактируют с жидкостью. Два плунжера работают поочередно: в то время как один из них подает элюент на колонку, цилиндр второго за-

полняется; потом они «меняются ролями». Автоматический поворотный кран (в центре вверху) соответственно переключает течение жидкости по тефлоновым трубкам. В момент переключения срабатывает специальная система, подавляющая пульсацию. Использование двухплунжерной схемы позволяет работать в широком диапазоне давлений, так как освобождает от необходимости использовать шариковые клапаны. Скорость подачи элюента можно регулировать в пределах 1—490 мл/ч. Контрольное устройство выключает насос, если давление в системе превысит наперед заданное предельное значение.

Для создания градиента элюции используют два насоса. Смеситель с магнитной мешалкой устанавливают на стороне выхода из насосов. Он изготовлен из пластика и рассчитан на давление до 50 атм; объем его камеры — 0,6 мл. Имеется возможность задания профиля элюции любой формы в виде последовательности линейных градиентов

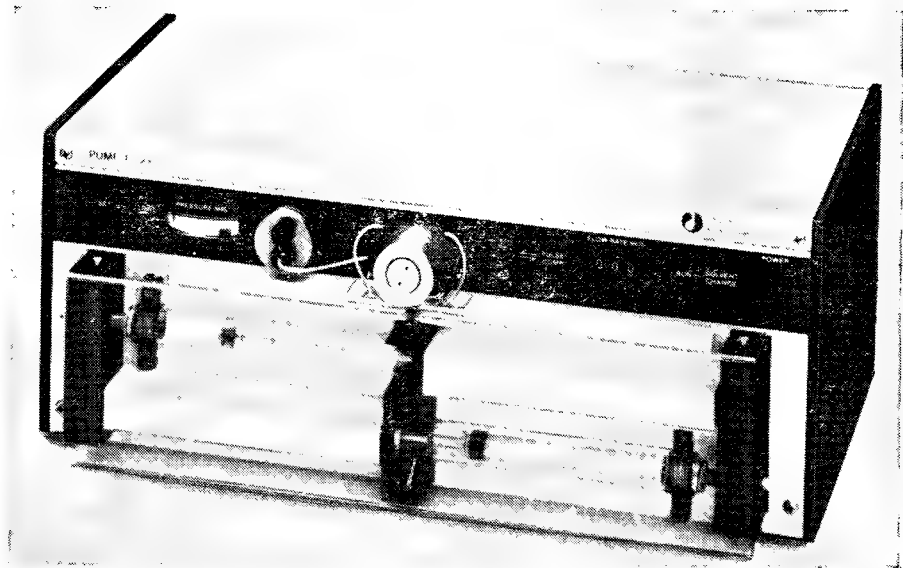


Рис. 55. Насос плунжерного типа Р-500 (фирма «Pharmacia»)

и изократической подачи элюента на участках, которые можно произвольно выбрать вдоль всего рабочего цикла. Этой цели служит программное устройство («Gradient programmer», GP-250 — см. рис. 54, внизу). С помощью клавиатуры (по времени или по объему элюента) задается разбиение на участки и процентное соотношение объемов двух буферов в начале и конце каждого участка. Профиль градиента записывается на ленте регистратора. В случае необходимости его можно корректировать в ходе элюции. Программное устройство управляет также работой коллектора фракций, регистратора, клапанов и инжектора. Десять различных программ такого рода могут храниться в памяти прибора.

Специально разработанный для работы с биологическими объектами инжектор поворотного типа также хорошо виден на рис. 54 — справа, над колонкой. Все его смачиваемые поверхности изготовлены из полиимида, устойчивого как к водно-солевым средам, так и к органическим растворителям. Вместе с тем инжектор рассчитан на давление до 100 атм. Он комплектуется петлями для препарата объемом 50, 100, 200 и 500 мкл. Кроме того, оригинальное устройство («Superloop») позволяет через инжектор вводить на колонку под давлением от насоса объемы до 50 мл.

На рис. 54 внизу справа, в непосредственной близости от оптического блока УФ-детектора, можно видеть саму хроматографическую колонку. Фирма «Pharmacia» не продает свои новые сорбенты отдельно, а только упакованными в колонки объемом 1 мл. Они изготовли-

ваются из толстостенного стекла — этим завершается обеспечение антикоррозийной устойчивости всего хроматографического тракта.

Вероятно, и в данном случае с окончательным суждением о достоинствах новой хроматографической системы следует подождать до тех пор, пока накопится достаточный опыт ее эксплуатации, но нельзя не оценить того обстоятельства, что она сконструирована специально для исследования биологических макромолекул. Разумеется, новый комплект приборов фирмы «Pharmacia» можно использовать не только с колонками этой же фирмы. В свете высказанных выше соображений о специфике хроматографии биополимеров надо полагать, что он найдет себе применение и в сочетании с появляющимися сейчас сорбентами на основе крупнопористых силикагелей.

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА

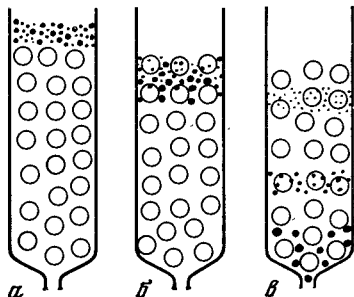
Привычное название «гель-фильтрация» для хроматографического метода фракционирования молекул по их размерам можно сохранить и в случае хроматографии при высоком давлении, где среди используемых жестких пористых матриц главную роль играет силикагель. Иногда используют и такие названия, как «молекулярно-ситовая» («molecular sieve») или «эксклюзивная» («exclusion...») хроматография.

ОСНОВНОЙ ПРИНЦИП

Неподвижная фаза при гель-фильтрации представлена жидкостью, находящейся внутри пористых, хорошо смачиваемых гранул, заполняющих хроматографическую колонку. Если на такую колонку подается растворенная в элюенте смесь молекул различных размеров, то крупные молекулы, неспособные проникнуть внутрь гранул, будут двигаться вдоль колонки вместе с подвижной фазой; для них коэффициент распределения $K = 0$. В то же время наиболее мелкие молекулы, размеры которых заведомо меньше диаметра пор в гранулах, будут равномерно распределяться между подвижной и неподвижной фазами. Для них будет осуществляться хроматографический процесс с присущим ему замедлением миграции хроматографической зоны; значение K при этом близко к единице. Для молекул промежуточной величины благодаря статистическому распределению размеров пор окажется доступной только часть объема неподвижной фазы. Для них $0 < K < 1$, поэтому зона или зоны таких молекул будут мигрировать вдоль колонки быстрее, чем мелкие молекулы, но медленнее, чем крупные. В результате произойдет фракционирование исходной смеси молекул на зоны в зависимости от их размеров. Зоны выходят из колонки в порядке убывания этих размеров (рис. 56).

Рис. 56. Принцип гель-фильтрации (кружки — гранулы пористой матрицы; черные точки разных размеров — компоненты смеси веществ)

а — момент внесения смеси на колонку;
б — начало фракционирования;
в — начало выхода из колонки фракции наиболее крупных молекул



В простейшем случае, когда в исходной смеси содержатся молекулы только двух категорий (крупные и мелкие), гель-фильтрация позволяет осуществить «сортировку» этих молекул («group separation»). В частности, таким образом проводят обессоливание растворов биополимеров и очистку макромолекул от сопутствующих им низкомолекулярных компонентов, например от «предшественников», участвующих в их биосинтезе. Смесь молекул нескольких промежуточных размеров в ходе гель-фильтрации разделяется на ряд дискретных групп, различающихся между собой по степени доступности для них объема внутри гранул. Соответствующие хроматографические зоны мигрируют с различными скоростями и выходят из колонки в виде разделившихся «пиков».

КОЭФФИЦИЕНТЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

В главе 1 понятие коэффициента распределения — основного параметра хроматографического процесса — было введено через равновесное отношение масс вещества, находящихся в неподвижной (M_s) и подвижной (M_m) фазах: $K = M_s/M_m$. Для идеального процесса гель-фильтрации (в отсутствие какой-либо сорбции молекул вещества) его концентрация в обеих фазах одинакова, так что коэффициент распределения можно представить отношением объемов неподвижной и подвижной фаз в пределах хроматографической зоны: $K = V_s/V_m$.

В однородной цилиндрической колонке отношение объемов, записанное для зоны, сохраняется и для всей колонки в целом. Вместо V_m в этом случае можно подставить V_0 — свободный объем колонки (вне гранул), а под V_s следует понимать суммарный объем жидкости внутри гранул всей колонки, доступный для молекул данного размера. Тогда $K = V_s/V_0$. Обозначим символом V_t полный объем пустой колонки, а V_i — полный внутренний объем всех гранул. Для очень мелких молекул $V_s = V_i$. Полезно иметь в виду, что из геометрических соображений при плотной упаковке шарообразных гранул любого размера $V_0 \approx 1/3 V_t$. Это не означает, что V_i в два раза больше V_0 , так как следует учитывать и объем, занимаемый твердым материалом матрицы. Тем не менее, для крупнопористых матриц вполне может оказаться, что $V_i > V_0$, а коэффициент распределения для малых молекул $K > 1$.

В общем случае долю внутреннего объема гранул, доступную для молекул данного размера, можно охарактеризовать неким коэффициентом K_d : $V_s = K_d V_i$. Очевидно, что его значения могут лежать в следующих пределах: $0 \leq K_d \leq 1$. Иногда вместо K_d используют обозначение K_D . В английской литературе K_d нередко тоже называют коэффициентом распределения («distribution coefficient»), однако это неудачно. K_d — это «коэффициент доступности» внутреннего объема гранул матрицы для молекул данного размера, в точно определенном выше смысле.

Величина K_d играет центральную роль в характеристике процесса гель-фильтрации, тем более что ее можно определить по результа-

там хроматографического эксперимента для каждой группы молекул определенного размера, выходящих отдельным пиком.

В гл. 1 было приведено соотношение (9) между объемом элюции зоны V_R (объемом элюента, вышедшим из колонки к моменту появления ее пика) и свободным объемом колонки: $V_R = V_0 + KV_0$. С учетом записанных выше формул для K и K_d это соотношение легко преобразовать так: $V_R = V_0 + V_s = V_0 + K_d V_i$, откуда

$$K_d = \frac{V_R - V_0}{V_i}. \quad (28)$$

Здесь все величины в правой части можно определить опытным путем. Для данной колонки V_0 можно найти как объем элюции очень крупных молекул, а V_i — через объем элюции очень мелких молекул и величину V_0 , когда $V_i = V_R - V_0$ (при этом $K_d = 1$). Однако при таком определении остается сомнение — не имеет ли место частичная сорбция мелких молекул внутри гранул, что привело бы к завышенному значению V_i . Поэтому на практике нередко предпочитают использовать другой коэффициент, характеризующий движение хроматографической зоны вдоль колонки при гель-фильтрации (K_{av}) и определяемый следующим соотношением:

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0}. \quad (29)$$

Легко видеть, что в знаменателе правой части здесь вместо внутреннего объема гранул фигурирует их полный объем. Объем пустой колонки V_t легко определить по ее внутреннему диаметру и длине или предварительно измерить, заполнив колонку водой.

Формула (29) ниоткуда не следует — она служит определением для величины K_{av} . Из сопоставления (28) и (29) ясно, что величина K_{av} пропорциональна K_d , так как их выражения отличаются только значениями постоянных (для данной колонки) знаменателей дроби. Кстати, индекс «ав» происходит не от английского слова «average» («средний»), как часто думают, а от «available», т. е. «доступный» («коэффициент доступности»).

В качестве высокомолекулярного вещества для определения V_0 на практике часто используют специальный окрашенный препарат — так называемый «голубой декстран» («Blue Dextran 2000»), производимый для этой цели фирмой «Pharmacia». Среднее значение его молекулярной массы — $2 \cdot 10^6$ Дальтон.

Отметим, что даже для самых мелких молекул при идеальной гель-фильтрации значение K_{av} должно быть меньше 1, так как $(V_t - V_0) > V_i$. Если же на практике оказывается, что $K_{av} \geq 1$ (т. е. $V_R \geq V_i$), то это указывает на наличие сорбции молекул вещества в неподвижной фазе, о чем речь пойдет ниже.

Следует уточнить способ определения объема элюции V_R (рис. 57). В случае острого пика этот объем измеряют до момента выхода из колонки его вершины. Если объем исходного препарата мал (не более 2% от V_i), то его можно не учитывать и отмеривать V_R с момента

начала внесения препарата на колонку. Если объемом препарата пренебречь нельзя, то в качестве начального момента для отсчета V_R берут тот момент, когда половина препарата внесена на колонку (рис. 57, а). При обессоливании или других вариантах препаративной гель-фильтрации, когда зоны вещества на выходе из колонки имеют протяженную «площадку», V_R следует измерять от начала внесения препарата на колонку до того момента, когда концентрация вещества на выходе колонки достигнет 50 % от своего максимального значения (рис. 57, б).

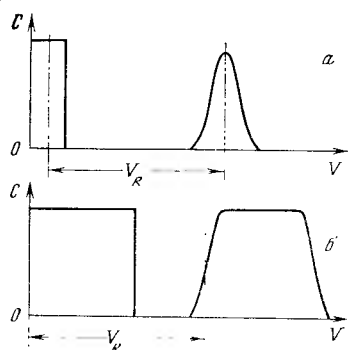


Рис. 57. Определение объема элюции V_R (см. текст)

ГРАФИК СЕЛЕКТИВНОСТИ

Для смесей молекул сходной формы и плотности, например различных глобулярных белков, попадающих (для данного геля) в категорию молекул промежуточного размера, было замечено, что уменьшение величины K_{av} связано с увеличением массы молекул зависимостью, которая в широком диапазоне значений оказывается почти линейной, если моле-

кулярную массу на графике откладывать в логарифмическом масштабе (рис. 58). Такого рода графики называют «графиками селективности». Ими удобно пользоваться для оценки возможности фракционирования гель-фильтрацией на матрице данного типа совокупности молекул, массы которых лежат в определенном интервале. Фирмы-производители матриц для гель-фильтрации приводят графики селективности в своих технических описаниях. На рис. 59 воспроизведены графики селективности для четырех типов сефадексов фирмы «Pharmacia». Очевидно, что для разделения смеси молекул с массой в интервале 10—40 тыс. Дальтон удобно воспользоваться сефадексом марки G-75, для интервала 20—50 тыс. более подходит G-100, а для интервала 20—100 тыс. — G-200.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

Из-за самой сути процесса гель-фильтрации ее эффективность должна быть заметно ниже, чем в других хроматографических методах. Действительно, здесь все пики (зоны) элюируемых фракций должны укладываться в объем элюента $V_R \leq V_i$, в то время как в других методах при $K \gg 1$ величина V_R может во много раз превосходить даже полный объем колонки. Вместе с тем при гель-фильтрации, как ни при каком другом хроматографическом методе, на расширение пиков и ухудшение их разрешения сильно влияет фактор неравновесности распределения вещества по объему жидкости в не-

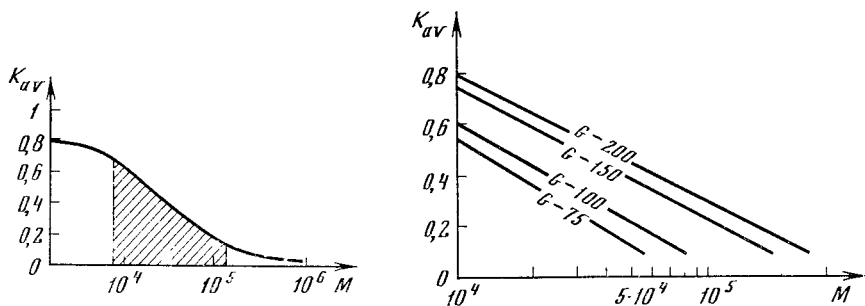


Рис. 58. График селективности матрицы для гель-фильтрации

M — молекулярная масса в Дальтонах (масштаб логарифмический); участок линейной зависимости K_{av} от $\lg M$ заштрихован

Рис. 59. Графики селективности сефадексов

подвижной фазе. Это обусловлено тем, что в случае гель-фильтрации размеры молекул должны быть соизмеримы с размерами пор, а это очень сильно затрудняет их диффузию внутри гранул.

Кстати, отсюда следует, что хуже всех разделяются самые крупные молекулы, которые едва входят внутрь гранул ($K_{av} = 0,1 \div 0,2$). Выгоднее, таким образом, выбрать пористость матрицы (по графикам селективности) так, чтобы разделение наиболее важных компонентов смеси происходило при значениях K_{av} в диапазоне $0,6-0,8$. Конечно, в этом случае интересующие экспериментатора компоненты смеси будут двигаться вдоль колонки медленнее, что будет способствовать расширению их пиков за счет продольной диффузии, но в отличие от других хроматографических методов такое замедление скажется не очень сильно, ибо полный объем элюции, как уже отмечалось, невелик. Неоднородность размеров гранул также особо неблагоприятно сказывается в методе гель-фильтрации, поскольку явления диффузии здесь играют главную роль.

В результате всего этого даже для гранул диаметром $20-40$ мкм высота теоретической тарелки в случае обычной гель-фильтрации составляет $2-5$ мм, т. е. разрешающая способность хроматографической колонки длиной 1 м характеризуется числом теоретических тарелок, равным $200-500$.

Отсюда следует, что число компонентов смеси веществ, которое в принципе можно разделить методом гель-фильтрации (при низком давлении), очень невелико. Показано [J. Morris, P. Morris, 1976], что число пиков (n), которое можно разделить с приемлемым разрешением ($R_s = 1$) на колонке, имеющей N теоретических тарелок, определяется соотношением

$$n = 1 + 0,2 \sqrt{N}. \quad (30)$$

При $N = 500$ получим $n = 5,46$. Таким образом, на колонке длиной 1 м нельзя рассчитывать разделить более пяти пиков. По

этой причине для гель-фильтрации иногда используют колонки длиной до двух и более метров. Набивка таких колонок сорбентом затруднена, а для гель-фильтрации качество набивки должно быть особенно высоким. Ко всему сказанному следует добавить, что реальные матрицы для гель-фильтрации нередко ведут себя неидеальным образом. Например, экспериментальные данные часто показывают, что K_{av} больше (а иногда — и намного) единицы. Это указывает на наличие сорбции. Ее причиной могут быть гидрофобные взаимодействия ароматических аминокислот или гетероциклических нуклеотидов с материалом матрицы или же ионные взаимодействия за счет присутствия в матрицах небольшого количества ионогенных групп, чаще всего карбоксилов. Так, в сефадексах их содержится до 0,2 мэкв на 1 г сухой матрицы. По этой причине вещества щелочной природы могут сильно задерживаться на колонке (например, аргинин на сефадексе G-25 в воде обнаруживает $K_{av} > 3$), а вещества кислого характера — наоборот, из нее выталкиваться. К счастью, описанные ионные взаимодействия легко блокировать, если в качестве элюента допустимо использовать разбавленный солевой раствор (0,02—0,05 M NaCl). Например, элюцию аспарагиновой и глютаминовой кислот на том же сефадексе в воде характеризует значение $K_d \approx 0,2$, а при введении 0,05 M NaCl оказывается, что истинное значение K_d для этих аминокислот — около 0,8. Указанные обстоятельства затрудняют обессоливание растворов биологических макромолекул, но эти затруднения можно обойти, если для нейтрализации зарядов матрицы использовать летучие соли (например, 0,01 M бикарбонат аммония), которые потом нетрудно удалить лиофилизацией или упариванием.

Для ослабления гидрофобных взаимодействий в элюент вводят детергенты или добавки органических растворителей. Взаимодействия за счет образования водородных связей подавляются введением мочевины. Все эти эффекты сорбции выражены тем сильнее, чем больший объем внутри гранул занимает сам материал матрицы. Так, для сефадексов они убывают в следующем ряду: G-10 > G-15 > G-25 > G-50. Начиная с сефадекса G-75, ими уже практически можно пренебрегать.

Матрицам на основе акриламида (биогели серии «Р») в меньшей степени, чем сефадексам, свойственна ионная сорбция (можно элюировать и водой), но гидрофобную сорбцию они проявляют заметно. Так, на биогеле Р2 для урацила и цитозина можно получить $K_d \approx 1,8$, а для аденина и гуанина — $K_d \approx 3,1$. Агароза обнаруживает «склонность» как к гидрофобной сорбции, так и к ионной (за счет остатков сульфокислоты).

Познакомившись с некоторыми специфическими особенностями гель-фильтрации, рассмотрим теперь подробнее номенклатуру и свойства применяемых здесь матриц. Общие сведения о материалах этих матриц были приведены в гл. 2; теперь же основное внимание уделим сопоставлению рабочих параметров различных наименований продукции, имеющейся на мировом рынке. Для этой цели в сжатой

форме рассмотрим основные сведения о выпускающихся сейчас матрицах из последних каталогов ряда ведущих фирм-производителей (фирмы, перепродающие ту или иную продукцию, перечислять не имеет смысла).

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОДАЖНЫХ МАТРИЦ

МАТРИЦЫ ДЛЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ ПРИ НИЗКОМ ДАВЛЕНИИ

Продукция фирмы «Pharmacia»

Сефадексы. Под этим торговым названием выпускается восемь типов матриц на основе декстрана — от наиболее мелкопористого сефадекса G-10 до самого крупнопористого G-200. Чем крупнее поры, тем больше воды связывается в гранулах при их набухании. Номер в маркировке сефадекса характеризует его пористость: он означает количество воды в миллилитрах, которое связывают 10 г сухого геля («water regain»). По размерам сферические гранулы сефадексов делятся в большинстве случаев на две категории: обычные (без дополнительных обозначений) материалы (интервал диаметров 40—120 мкм) и мелкозернистые (10—40 мкм). Последним присвоено обозначение «Superfine», которое фигурирует в названии типа сефадекса. Два наиболее распространенных типа сефадексов (G-25 и G-50), помимо категории «Superfine», имеют еще три диапазона размеров: «Fine» (20—80 мкм), «Medium» (50—150 мкм) и «Coarse» (100—300 мкм). Зато мелкопористые типы (G-10 и G-15) выпускаются только в виде гранул обычного размера (40—120 мкм). Нельзя не обратить внимание на то, что допустимый разброс диаметров гранул каждого типа очень велик по сравнению с теми цифрами, которые фигурировали в конце предыдущей главы: в процентном выражении он составляет $\pm 50\%$, а для двух наиболее мелких категорий $\pm 60\%$. В аналитических вариантах колоночной гель-фильтрации обычно используют категории «Fine» и «Superfine». «Medium» следует предпочесть для препаративных опытов, а «Coarse» — для фракционирования в свободном объеме. Для гель-фильтрации в тонком слое используют только сефадексы категории «Superfine».

Ниже указаны области фракционирования («fractionation range») макромолекул по их массе для всех типов и категорий сефадексов (все четыре категории размеров G-25 и G-50 имеют одинаковые характеристики. См. стр. 116).

Эти области даны в максимально широких границах: меньшая цифра соответствует молекулам, для которых доступен весь объем внутри гранул ($K_d = 1$), большая — молекулам, практически не проникающим в гранулы ($K_d = 0$). Верхнюю границу называют иногда «пределом исключения» молекул из гранул («exclusion limit»). Указанные выше области фракционирования заметно шире, чем линейные участки соответствующих графиков селективности на рис. 54. Отметим еще, что значения пределов исключения, да и всей ширины

Тип сефадекса	Область фракцио- нирования для глобу- лярных белков, тыс. Дальтон	Удельный объем упакованных гранул на 1 г сухого сефадекса	Тип сефадекса	Область фракцио- нирования для глобу- лярных белков, тыс. Дальтон	Удельный объем упакованных гранул на 1 г сухого сефадекса
G-10	< 0,7	2—3	G-100	4—150	15—20
G-15	< 1,5	2,3—3,5	G-100	4—100	15—20
G-25	1—5	4—6	Superfine		
G-50	1,5—30	9—11	G-150	5—300	20—30
G-75	3—80	12—15	G-150	5—150	18—22
G-75	3—70	12—15	Superfine		
Superfine			G-200	5—600	30—40
			G-200	5—250	20—25
			Superfine		

области фракционирования, если их выражать в единицах молекулярной массы, весьма существенно зависят от формы и плотности упаковки полимерных цепей в макромолекулах. Ниже эта проблема рассмотрена подробно, а пока отметим, что приведенные данные получены для белков глобулярной формы. Нередко в каталогах фирм фигурируют значения пределов исключения по молекулярной массе, измеренные для декстранов. Следует иметь в виду, что эти значения значительно меньше, чем соответствующие цифры для белков, поскольку декстраны имеют структуру рыхлых статистических клубков, в то время как нативные белки представляют собой плотно упакованные глобулы.

Выше приведены также значения удельных объемов упакованных в колонку набухших гранул сефадекса. Эти данные удобно использовать при подготовке материала для заполнения колонки. Следует отметить, что пределы исключения для сефадексов категории «Superfine» значительно ниже, чем у обычных сефадексов того же типа. Соответственно несколько иначе расположены и прямые на их графиках селективности (рис. 60).

Матрицы для гель-фильтрации с аналогичными свойствами выпускает также венгерская фирма «Reanal» под названием «Молселект» (Г-10 — Г-200).

Во влажном состоянии при нейтральных значениях pH сефадексы можно стерилизовать при температуре 110°. В сухом виде они выдерживают нагревание до 120°, однако при более высокой температуре начинается карамелизация. О сорбционных и ионообменных свойствах сефадексов было сказано выше. Добавим, что окисление кислородом, содержащимся в элюенте, приводит к появлению новых карбоксильных групп и постепенному усилению ионообменных свойств сефадекса, поэтому водные элюенты следует деаэрировать. Сильные окислители разрушают сефадексы; степень их устойчивости к действию кислот и щелочей рассмотрена в гл. 2. Сефадексы не растворяются в органических растворителях, хотя и набухают во многих из них (особенно хорошо — в формамиде и диметилсульфокси-

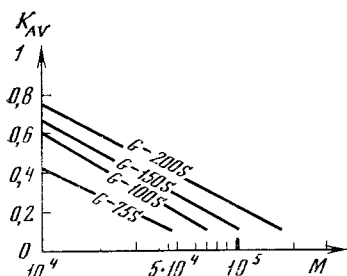


Рис. 60. Графики селективности сефадексов типа «Superfine»

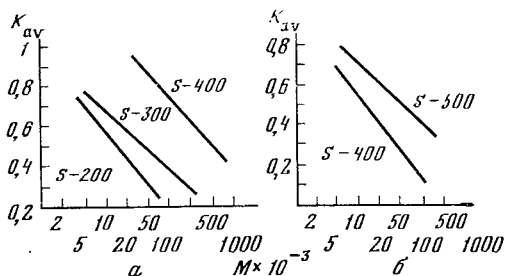


Рис. 61. Графики селективности сефакрилов для глобулярных (а) и денатурированных (б) белков

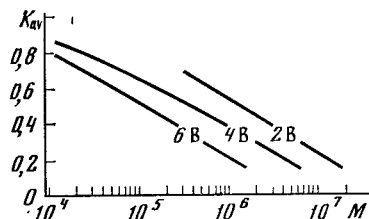


Рис. 62. Графики селективности сефарозы

де). Набухание в водных растворах не зависит от присутствия солей, детергентов и мочевины. Остатки борной кислоты могут образовывать комплексы с молекулами декстрана, что следует учитывать при использовании боратных буферов.

Для особо трудных случаев фракционирования разброс диаметров гранул сефадекса типа «Fine» или «Superfine» может оказаться слишком широким. Можно отобрать фракции более близких по диаметру гранул путем фракционирования набухшего сефадекса в токе воды, как было описано в гл. 3. Неудобство здесь заключается в том, что остальные фракции, кроме отобранной, надо хранить во влажном виде или высушивать. Описано устройство для сортировки сефадексов по узким интервалам размеров в сухом виде — в токе воздуха [Ekman et al., 1976]. Подчеркнем еще раз важность тщательного проведения операции «отмучивания» при работе с сефадексом. Кстати, было замечено, что скорость течения колонки и воспроизводимость результатов опытов при использовании сефадекса G-200 «Superfine» (это — трудный случай) значительно улучшаются, если отмучивание проводить в холодном эфире — шесть раз по 30 с с последующей сушкой [Kawata, Chase, 1968].

Сефакрилы. Структура, а также химические и адсорбционные свойства материала этих матриц (декстран, сшитый метиленабисакриламидом) были описаны выше. Главным его достоинством — по сравнению с сефадексом — является жесткость, благодаря чему гелефильтрацию на сефакрилах, в том числе на крупнопористых, можно вести при относительно больших скоростях элюции.

Выпускается пять типов сефакрилов (от S-200 до S-1000; все — «Superfine»), различающихся по пористости, но с одинаковым разбросом диаметров сферических гранул: 40—105 мкм. Это соответ-

вует вариации среднего размера, превышающей $\pm 40\%$. Сефакрилы поставляются уже набухшими, в виде густой водной суспензии.

Ниже указаны области фракционирования продажных сефакрилов — как для глобулярных белков, так и для декстранов:

Тип сефакрила	Область фракционирования, тыс. Дальтон	
	для глобулярных белков	для декстранов
S-200	5—250	1—80
S-300	10—1500	1—750
S-400	20—8000	10—2 000
S-500	—	40—20 000
S-1000	—	500—100 000

Последнее оказалось необходимым из-за того, что сефакрилы S-500 и S-1000, предназначенные для фракционирования нуклеиновых кислот и полисахаридов, имеют столь крупные поры, что прокалибровать их по молекулярным массам белков не представляется возможным.

На рис. 61 представлены графики селективности сефакрилов для двух вариантов фракционирования белков: нативных (глобулярных) и денатурированных, имеющих форму статистических клубков (в 6 М растворе гуанидинхлорида). Как и в случае сефадексов, линейные участки графиков лежат в более узком интервале молекулярных масс, чем вся область фракционирования. Кроме того, весьма существенно отличаются друг от друга графики для нативных и денатурированных белков. Например, легко видеть, что нативный белок с $M = 100\,000$ на сефакриле S-400 должен иметь $K_{av} = 0,75$, а в денатурированном виде на том же S-400 он будет двигаться в соответствии с $K_{av} = 0,42$, т. е. значительно быстрее. Этого и следовало ожидать из-за различия в плотности упаковки нативных и денатурированных белков.

Как видно из представленных данных, сефакрилы пригодны для фракционирования или очистки крупных макромолекул, но не могут заменить сефадексы малых номеров, пригодные для работы с относительно низкомолекулярными объектами. Как будет видно из сопоставления с данными, приведенными ниже, сефакрилы могут успешно конкурировать с гелями агарозы. Пористость сефакрила S-1000 «Superfine» — примерно такая же, как у 0,5%-ной агарозы, а сефакрила S-400 «Superfine» — как у 5%-ной. Однако на стороне сефакрилов — преимущество в том, что их можно автоклавировать.

Жесткость сефакрилов, в том числе и наиболее крупнопористых, позволяет использовать их в водных буферах со скоростями элюции порядка $40\text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$ и не слишком сильно снижать их при работе с вязкими элюентами. Так, сефакрил S-400 не сжимается при элюции колонки 6 М раствором гуанидинхлорида со скоростью $20\text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$, а сефакрил S-1000 позволяет с такой же скоростью вести элюцию чистым формамидом. Разумеется, столь высокие скорости

элюции можно использовать только для обессоливания или сортировки молекул. В интересах обеспечения равновесного обмена между фазами фракционирование приходится вести при скоростях 2—10 мл/см²·ч. Жесткость сефакрилов облегчает набивку колонок и позволяет вести их уравнивание при скорости 20—40 мл/см²·ч. Химическая стойкость дает возможность вести регенерацию колонок путем длительной промывки 0,2 М раствором NaOH.

Сефакрилы используют для очистки плазмид, рибосом и даже целых вирусов, для фракционирования рестриктазных фрагментов ДНК и др. Соответствующие примеры приведены ниже.

Сефароза. Фирма «Pharmacia» выпускает три типа матриц для гель-фильтрации на основе гелей агарозы с торговым названием «Sepharose»:

Марка сефарозы	Концентрация агарозы, %	Диаметр гранул, мкм	Область фракционирования для глобулярных белков, тыс. Дальтон
6B	6	45—165	10—4 000
4B	4	60—140	60—20 000
2B	2	60—200	70—40 000

Как видно из приведенных данных, процентное содержание агарозы в гелях отражено в маркировке этих матриц. Диаметры здесь даны для набухших гранул. На рис. 62 представлены графики селективности матриц сефарозы.

Сефароза поставляется в виде суспензии, подсушивания которой не следует допускать (см. гл. 2). Разброс диаметров гранул столь же велик, как у сефадексов. Гели сефарозы жесткие, но несколько уступают в этом отношении сефакрилам. Гранулы сефарозы отличаются хрупкостью и сравнительно легко крошатся при неосторожном перемешивании. Сефарозу нельзя использовать при температуре выше 40°, а следовательно, автоклавирование исключено. В случае необходимости стерилизацию ведут обработкой диэтилпиروкарбонатом. Сефароза не отличается и химической стойкостью: детергенты и 6 М раствор гуанидинхлорида ее постепенно разрушают, рабочий диапазон pH относительно узок (pH 4—9). Более того, было показано, что в присутствии солей даже умеренное подкисление приводит к сужению пор и существенному усилению поверхностной сорбции. Эти нежелательные явления обнаруживаются уже при pH 5,5 в 0,2 М растворе CH₃COONa [Lin, Castell, 1978]. При более высоких концентрациях соли и более низких pH сорбция становится столь существенной, что ею удалось воспользоваться для разделения пяти изоакцепторных фракций тРНК. Элюцию в этом случае вели «обратным» (снижающимся) градиентом концентрации сульфата аммония (от 1,3 М до нуля в ацетатном буфере, pH 4,5) [Holmes et al., 1975]. Разумеется, о гель-фильтрации при этом не может быть и речи. При значениях pH, близких к нейтральным, остаточную сорбцию можно, как обычно, подавить введением в элюент 0,02 М NaCl.

Химически «сшитая» сефароза. Матрицы на основе геля агарозы, химически «сшитого» дибромпропанолом (см. гл. 2), выпускаются с теми же значениями процентного содержания агарозы и размеров гранул, что и обычные сефарозы. В торговом обозначении наличие «сшивки» указывается буквами «CL» («cross-linked»), например «Sepharose CL-4B». Области фракционирования и графики селективности — практически такие же, как и для соответствующих типов обычной сефарозы. Однако «сшивка» придает сефарозе большую жесткость, сопоставимую с жесткостью сефакрила. Максимально допустимые скорости течения элюента при использовании такой сефарозы в водных буферах увеличиваются в 1,5 раза, а при гель-фильтрации в 6 М растворе гуанидинхлорида — почти в 4 раза. Химическая стойкость модифицированной матрицы, особенно в щелочной области, заметно возрастает. Колонку, заполненную сефарозой этого типа, можно промывать 2 М NaOH в течение 2 ч без нарушения характеристик геля. «Сшитую» сефарозу можно и автоклавировать.

В отличие от сефадексов и обычной сефарозы, пористость «сшитой» сефарозы практически не меняется при переходе от водных растворителей к органическим. При этом она устойчива к их воздействию, что облегчает проведение разнообразных химических реакций замещения с целью получения аффинных сорбентов. Вместе с тем отметим, что активация сефарозы «CL» бромистым цианом (для присоединения аффинных лигандов) происходит с вдвое более низкой эффективностью, чем в случае обычной сефарозы. Это объясняется тем, что «сшивка» идет по тем же самым гидроксилам, что и активация с помощью BrCN.

Содержание остатков сульфокислоты в «сшитой» сефарозе гораздо ниже, а связанная с ними ионная сорбция — значительно слабее, чем у обычной сефарозы, поскольку в процессе ее изготовления осуществляется специальное десульфирование путем щелочного гидролиза в восстанавливающей среде. «Sepharose CL» поставляется в виде густой водной суспензии с добавкой 0,02% азида натрия. Сама по себе «сшитая» сефароза очень устойчива к атаке микроорганизмов, но во избежание их роста в жидкой среде хранить эту сефарозу следует также в присутствии Na_3N_3 .

Продукция фирмы «Bio-Rad»

Биогели серии А. Американская фирма «Bio-Rad» выпускает агарозные матрицы для гель-фильтрации под торговым наименованием «Bio-Gel A». Нет нужды останавливаться на свойствах этих матриц — они аналогичны тем, что были описаны для сефарозы. Ниже представлены параметры шести типов этих матриц.

Первые четыре типа производятся в виде сферических гранул трех диапазонов диаметров: 150—300 мкм (50—100 МЕШ), 80—150 мкм (100—200 МЕШ) и 40—80 мкм (200—400 МЕШ); два последних типа выпускаются в виде гранул только двух диапазонов: 50—100 и 100—200 МЕШ. Отметим, что диапазон 200—400 МЕШ намного уже, чем диапазоны размеров гранул сефарозы, а это — немало-

Марка биогеля	Концентрация агарозы, %	Область фракционирования для глобулярных белков и нуклеиновых кислот, тыс. Дальтон	Марка биогеля	Концентрация агарозы, %	Область фракционирования для глобулярных белков и нуклеиновых кислот, тыс. Дальтон
A-0,5 m	10	10— 500	A-15 m	4	40— 15 000
A-1,5 m	8	10—1 500	A-50 m	2	100— 50 000
A-5 m	6	10—5 000	A-150 m	1	1 000—150 000

важное преимущество биогелей серии А. Легко заметить, что цифра в названии геля указывает верхнюю границу области фракционирования, т. е. предел исключения в миллионах Дальтон. Эти биогели поставляются, как и сефароза, в виде водной суспензии с добавлением 0,02% азиды натрия. Соответствующие графики селективности представлены на рис. 63. Вместо K_{av} здесь используется другой параметр — отношение объема элюции V_R к свободному объему колонки V_0 .

Биогели серии Р. Кроме агарозных, фирма «Bio-Rad» выпускает сферические матрицы на основе полиакриламидного геля под общим торговым наименованием «Bio-Gel Р». Пористость геля, как и при электрофорезе, определяется концентрацией в нем акриламида. Основные параметры этих биогелей таковы:

Марка биогеля	Область фракционирования для глобулярных белков, тыс. Дальтон	Удельный объем упакованных гранул, мл на 1 г сух. матрицы	Марка биогеля	Область фракционирования для глобулярных белков, тыс. Дальтон	Удельный объем упакованных гранул, мл на 1 г сух. матрицы
P-2	0,1—1,8	3,5	P-60	3—60	14
P-4	0,8—4	5	P-100	5—100	15
P-6	1—6	8	P-150	15—150	18
P-10	1,5—20	9	P-200	30—200	25
P-30	2,5—40	11	P-300	60—400	30

Как видно из приведенных данных, диапазоны пористости и соответственно области фракционирования для этих биогелей примерно такие же, как у сефадексов. Первые четыре типа выпускаются в виде гранул четырех диапазонов размеров: 150—300 мкм (50—100 МЕШ), 80—150 мкм (100—200 МЕШ), 40—80 мкм (200—400 МЕШ) и менее 40 мкм (<400 МЕШ). Остальные типы представлены тремя диапазонами размеров (за вычетом 200—400 МЕШ). Биогели серии Р поставляются в сухом виде, поэтому выше указаны также объемы упакованной набухшей матрицы. На рис. 64 в тех же координатах, что и на предыдущем рисунке, представлено семейство графиков селективности для биогелей типа Р. Матрицы этого типа имеют некоторые преимущества перед сефадексами. Во-первых,

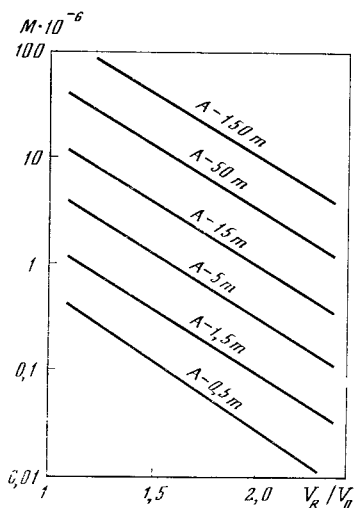


Рис. 63. Графики селективности биогелей серии А

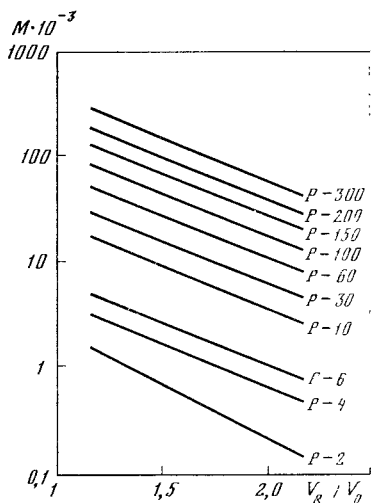


Рис. 64. Графики селективности биогелей серии Р

содержание карбоксильных групп в них намного ниже (по фирменным данным — менее 3 мкэкв/г), что позволяет вести обессоливание макромолекул в очень разбавленных буферах. Однако следует помнить, что дезамидирование акриламида приводит к появлению дополнительных карбоксиллов. Это явление заметно вблизи границ допустимого диапазона рН (3—8). Более того — замечено, что отрицательные заряды, возникающие, по-видимому, также за счет гидролиза амидов, появляются в биогелях типа Р при кипячении в водных буферах даже при нейтральных значениях рН [Calabro, Holloway, 1976]. Между тем, фирма утверждает, что эти биогели можно автоклавировать, а экспериментаторы (по аналогии с принятой для сефадексов практикой, см. ниже) для ускорения набухания нередко кипятят их в воде; этого, очевидно, делать не следует. После автоклавирования необходимо быть готовым к возможности побочных взаимодействий вещества с матрицей (их блокируют введением в элюент соли). Гидрофобная сорбция на биогелях происходит примерно так же, как на сефадексах. Второе преимущество биогелей серии Р — наличие более узкого диапазона размеров гранул для аналитического фракционирования (40—80 мкм по сравнению с 40—120 или 20—80 мкм для сефадексов). Есть и недостатки: как видно из изложенного, биогели химически менее стойки. Колонки, заполненные крупнопористыми биогелями, менее чувствительны к перепадам давления, но элюент через них (при одинаковых перепадах) течет медленнее, чем через колонки сефадекса с аналогичными хроматографическими параметрами. Вообще говоря, колонки биогелей любых номеров — более «медленные», чем колонки соответствующих сефадексов.

Продукция фирмы «ЛКВ»

Ультрогели серии А. Сферические агарозные матрицы типа «Ultrigel» А2, А4 и А6 мало чем отличаются от матриц фирмы «Pharmacia» («Sepharose» 2В, 4В и 6В). Диапазон диаметров гранул для всех трех типов ультрогелей — 60—140 мкм. Фирменное описание указывает несколько более широкий диапазон рН (3—10). Пределы исключения и линейные участки областей фракционирования примерно одинаковы для обоих типов матриц. То же самое относится к максимально допустимым перепадам давления (см. ниже). Для наилучшего разрешения пиков фирма рекомендует работать на скоростях элюции 3—5 мл/см²·ч для ультрогеля А2 и 4—6 мл/см²·ч для А4 и А6. Под теми же названиями с аналогичными характеристиками выпускает агарозные гели французская фирма «IBF».

Ультрогели серии АсА. Как отмечалось в гл. 2, полимеризация сетки акриламидного геля внутри жесткого каркаса агарозы придает этим матрицам дополнительную жесткость при сохранении возможности фракционирования относительно низкомолекулярных веществ («АсА» обозначает «acrylamide — agarose»). Жесткость матриц ультрогелей серии АсА дает им преимущества перед биогелями серии Р, однако в том, что касается возможности работать при повышенной температуре, для них сохраняются ограничения, свойственные агарозе. Химическая стойкость этих ультрогелей определяется совокупностью уязвимых мест полиакриламида и агарозы. Рабочий диапазон рН, как и для ультрогелей серии А, более широк, чем для агарозы (рН 3—10).

Фирма «ЛКВ» поставляет пять типов ультрогелей серии АсА. Их состав и эффективные области фракционирования (т. е. линейные участки графиков селективности) таковы:

Марка ультрогеля АсА	Концентрация, %		Эффективная область фракционирования для глобулярных белков, тыс. Дальтон	Марка ультрогеля АсА	Концентрация, %		Эффективная область фракционирования для глобулярных белков, тыс. Дальтон
	акрил-амида	агарозы			акрил-амида	агарозы	
202	20	2	1—15	34	3	4	20—350
54	5	4	5—70	22	2	2	100—1200
44	4	4	10—130				

Все они выпускаются в виде сферических гранул одного и того же интервала диаметров (60—140 мкм). Легко заметить, что последняя цифра в маркировке ультрогеля обозначает процентное содержание агарозы, а предшествующая ей — содержание акриламида. Эти ультрогели поставляются в виде водной суспензии уже набухших гранул. Для наилучшего разрешения пиков фирма рекомендует следующие скорости элюции: для АсА 202 — 4—6 мл/см²·ч, 54 и 44 — 3—6, 34 — 3—5, а для АсА 22 — 2—3 мл/см²·ч. Ультрогели серии АсА продаются также фирмой «IBF».

Фирма «Serva», как указывалось выше, предлагает серию сферических матриц на силикагелевой основе с полнольным покрытием типа «SP» со следующими средними значениями диаметров пор: 75, 150, 300, 500, 1200 и 3000 Å. Диапазоны диаметров гранул: 40—100 и 100—200 мкм. Высокая жесткость матриц позволяет вести гель-фильтрацию на повышенной скорости.

МАТРИЦЫ ДЛЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ

Ниже приведены характеристики ряда матриц на основе силикагеля, разработанных для гель-фильтрации биополимеров ведущими фирмами, производящими сорбенты для ЖХВД (для продукции фирм «Waters» и «LKB» указаны области фракционирования по белкам, для матриц остальных фирм — пределы исключения по декстрану):

Тип матрицы	Область фракционирования по глобулярным белкам или предел исключения по декстрану, тыс. Дальтон	Тип матрицы	Область фракционирования по глобулярным белкам или предел исключения по декстрану, тыс. Дальтон
<i>Фирма «Waters»</i>		<i>Фирма «LKB» («Blue columns»)</i>	
μ Porasil GPC 60A	0,4—10	Ultropac TSK G 2000 SW	0,5—60
μ Bondagel E 125	2—50	Ultropac TSK G 3000 SW	1—300
μ Bondagel E 500	5—500	Ultropac TSK G 4000 SW	5—1000
μ Bondagel E 1000	50—2000		
Protein column I-60	1—20	<i>Фирма «Brownlee Labs»</i>	
Protein column I-125	2—80	Aquapore OH-100	90
Protein column I-250	10—500	Aquapore OH-300	800
<i>Фирма «Beckman» («Altex»)</i>		Aquapore OH-500	2000
Sphergel-TSK G 2000 SW	70	Aquapore OH-1000	20 000
Sphergel-TSK G 3000 SW	300	Aquapore OH-4000	Не опред.
Sphergel-TSK G 4000 SW	1000		
<i>Фирма «Varian»</i>			
MicroPak TSK 2000 SW	20		
MicroPak TSK 3000 SW	150		
MicroPak TSK 4000 SW	600		

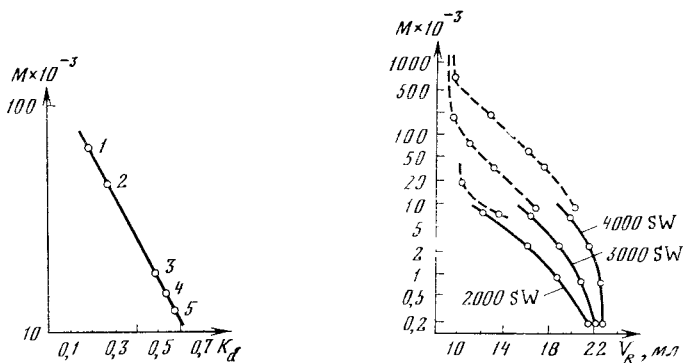


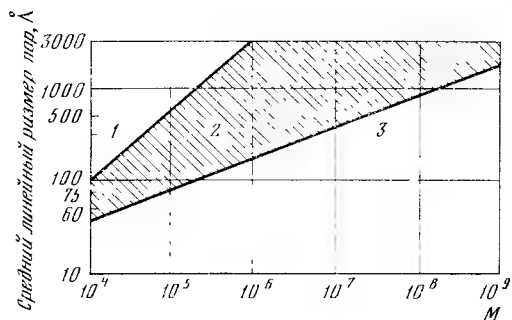
Рис. 65. График селективности для колонки типа I-125 фирмы «Waters»

1 — БСА ($M = 67 \times 10^3$); 2 — яичный альбумин ($M = 45 \times 10^3$); 3 — миоглобин ($M = 17 \times 10^3$); 4 — рибонуклеаза ($M = 13,7 \times 10^3$); 5 — цитохром с ($M = 12,5 \times 10^3$)

Рис. 66. Графики селективности для трех продажных силикагелевых колонок ($0,75 \times 30$ см) с матрицами типа «Sphergel TSK SW» фирмы «Beckman»

Калибровка по декстранам (пунктирные линии) и полиэтиленгликолям (сплошные линии).

Рис. 67. График соотношения области фракционирования глобулярных макромолекул на силикагелевой матрице и среднего линейного размера ее пор



1 — область доступности полного внутреннего объема пор для макромолекул;

2 — область фракционирования;

3 — область «исключения» (поры матрицы совершенно недоступны для макромолекул)

Все они поставляются в виде готовых колонок стандартного размера ($0,75 \times 30$ и $0,75 \times 60$ см). Средний диаметр сферических гранул — 10 мкм (для TSK 4000 — 13 мкм). Адсорбционные свойства силикагеля блокированы насыщением водой (« μ Porasil GPC») или присадкой эфирных групп (« μ Bondagel E»). На рис. 65 приведен график селективности для колонки I-125 фирмы «Waters» ($0,75 \times 30$ см), специально разработанной для гель-фильтрации белков.

Колонки серий «TSK», предлагаемые фирмами «Beckman», «Varian» и «LKB», по-видимому, базируются на разработках японской фирмы «Toyo Soda Company», которая первой начала выпускать колонки с маркировкой «TSK-GEL 3000 SW» и «TSK-GEL 4000 SW». На рис. 66 показаны графики селективности для колонок, заполненных различными марками матриц фирмы «Beckman». Ввиду фиксированного объема колонки по оси абсцисс вместо величины $K_{ав}$ или K_d отложены просто объемы элюции V_R . Уместно заметить, что, по данным фирмы, эти графики построены для скорости элюции.

1 мл/мин, т. е. 135 мл/см²·ч, однако нет уверенности, что при такой скорости реализовалось равновесное распределение макромолекул декстранов между подвижной и неподвижной фазами (см. ниже).

В силикагелях серии «Aquaroge OH» сорбция блокирована присадкой глицерилпропилсилана. Цифры от 100 до 1000 в маркировках матриц этой серии обозначают средний размер пор в ангстремах. Такие же обозначения и тот же ряд размеров пор использует фирма «Applied Sci» для своих матриц типа «Syn Chromapak GPC». Наконец, фирма «Sigma» продает матрицы на основе пористого стекла, поверхностная активность которого блокирована присадкой остатков глицерина, под торговым названием «Glyceryl-Glass Controlled Pore» (GGCP) с 11 значениями размеров пор в пределах от 75 до 3000 Å. Эти матрицы широкого распространения для гель-фильтрации биологических макромолекул не получили.

Здесь уместно заметить, что определение среднего размера пор — дело трудное; его результаты зависят от природы матрицы и потому ненадежны. Убедительной корреляции между областью фракционирования биополимеров и размером пор установить не удастся. По этой причине большинство фирм среди параметров матриц для гель-фильтрации размеров пор не указывают, а ограничиваются областью фракционирования. В каталоге фирмы «Serva» (1983 г.) приведен график взаимозависимости этих величин для матриц на основе силикагеля (рис. 67). Его следует рассматривать как сугубо ориентировочный.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ ПРИ НИЗКОМ ДАВЛЕНИИ

ПОДГОТОВКА МАТРИЦЫ

Для гель-фильтрации при высоком давлении используются уже готовые фирменные колонки. Их подготовка ограничивается заменой элюента, если это необходимо. Колонки низкого давления, как правило, заполняются в лаборатории. Готовые пластиковые колонки для обессоливания, наполненные сефадексом G-25 «Medium» ($V_t = 9.1$ мл), предлагает фирма «Pharmacia» под маркой PD-10.

Как было отмечено, большинство матриц для гель-фильтрации при низком давлении поставляется в виде водных суспензий. Их подготовка сводится к замене буфера и удалению консервирующих добавок декантацией. Одновременно разбавляют суспензию до удобной консистенции кашицы, а если нужно, то предварительно разделяют на фракции более узкого диапазона размеров (см. гл. 3). Освободиться от мелких частиц («fines») нет необходимости.

Сефадексы и бiogели серии Р поставляются в сухом виде, так что им нужно дать хорошо набухнуть в воде или буфере. Рассчитанное с учетом объема упакованной набухшей матрицы количество порошка высыпают тонкой струей в стакан с жидкостью (ее следует

взять с запасом, исходя из приведенных выше данных), перемешивая стеклянной палочкой. Нельзя приливать жидкость к порошку — это может привести к образованию комков. Перемешивать надо осторожно, чтобы не разрушать гранулы. Пользоваться для этой цели магнитной мешалкой не следует. При комнатной температуре для полного набухания сефадексов G-10—G-50 требуется 3 ч, G-75 рекомендуется оставить для набухания на сутки, а более крупные номера — на 3 сут. Эту процедуру можно существенно ускорить, если проводить ее на кипящей бане: для названных групп сефадексов она займет тогда соответственно 1, 3 и 5 ч. Одновременно произойдет и деаэрация жидкости. Уже упоминалось, что держать биогели серии Р долгое время в горячей воде не следует. При комнатной температуре биогели Р-2—Р-10 набухают за 4 ч, Р-30 и Р-60 — за 12 ч, Р-100 и Р-150 — за сутки, Р-200 и Р-300 — за двое суток. Можно предварительно нагреть буфер до 90° (и тем самым его деаэрировать), засыпать в него биогель, дать остыть и далее держать при комнатной температуре. Это позволяет втрое сократить время набухания. Завершение процесса набухания геля до его внесения в колонку — необходимое условие ее нормальной работы. В противном случае гель продолжает набухать уже в колонке, гранулы деформируются и скорость течения элюента сильно падает.

Сухие гели истираются при транспортировке, поэтому от мелких частиц надо освободиться повторной декантацией («отмучиванием»), как было описано в гл. 3. Одновременно гель переводят в нужный для элюции буфер. Если набухание геля проходило при комнатной температуре, то его суспензию после отмучивания необходимо деаэрировать, как обычно, в колбе Бунзена. Не следует ее при этом интенсивно перемешивать во избежание дальнейшего истирания. Элюирующий буфер также деаэрируют.

Заполненную гелем колонку, хранившуюся в холодной комнате, не следует перед использованием держать при комнатной температуре. Это может привести к образованию микропузырьков воздуха в материале колонки за счет выхода ранее растворенного в жидкости газа. Если охлажденную колонку надо использовать при комнатной температуре, ее следует сразу же промыть деаэрированным при комнатной температуре буфером.

НАБИВКА КОЛОНКИ

Процедура набивки колонки описана в гл. 3. Все операции производят особенно тщательно, так как при гель-фильтрации, как ни при каком другом методе хроматографии, однородность набивки колонки необходима для хорошего разрешения пиков. Например, во время заполнения колонки надо проверить, нет ли одностороннего ее нагревания близко расположенным источником тепла, солнцем или же охлаждения сквозняком. Повышенные требования предъявляются к самим колонкам и остальным элементам хроматографической системы в отношении величины «мертвого» объема

под колонкой, возможности перемешивания жидкости в трубках, кювете детектора и др. В ответственных случаях фракционирования следует использовать колонки, снабженные адапторами.

Уже упоминалось, что ввиду сжимаемости многих матриц для гель-фильтрации перепад давлений, приходящийся на колонку, и максимальную скорость элюции (эти величины взаимосвязаны) в ряде случаев следует ограничивать. Подчеркнем, что эти ограничения необходимы не только уже в ходе хроматографического процесса, но и во время заполнения колонки. Как будет показано ниже, наиболее мягкие матрицы не выдерживают даже гидравлического напора, обусловленного высотой самой колонки. Разность уровней в этом случае надо уменьшать с помощью защитной петли на ее выходе. Для сефадексов от G-10 до G-75, сефароз CL-6B и CL-4B, биогелей P-2—P-10, A-0,5m и A-1,5m, а также всех сефакрилов эта проблема не возникает, поскольку они обладают достаточной

жесткостью, чтобы без деформаций выдерживать любые разумные скорости течения, которые могут быть использованы даже в таком быстром процессе, как обессоливание. При заполнении колонки гидравлический напор, втрое превышающий ее высоту, для них еще не опасен.

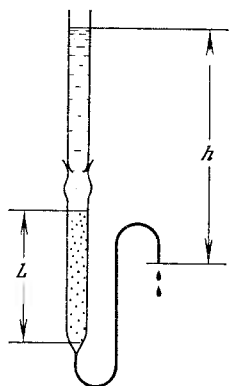
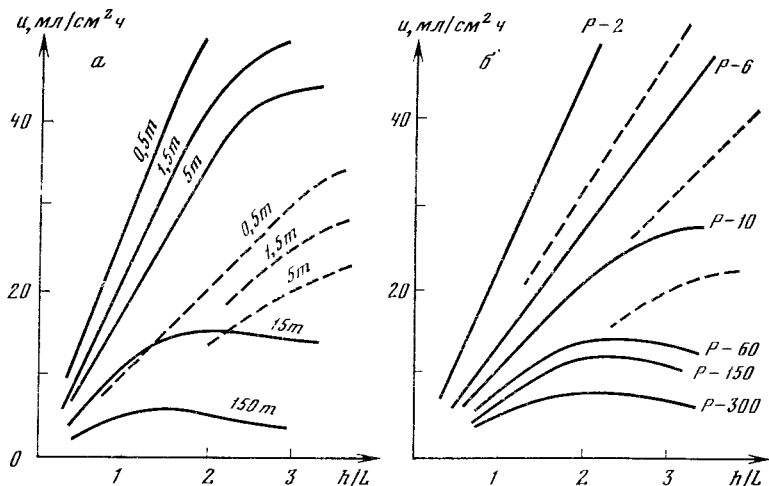


Рис. 68. Определение гидравлического напора

Рис. 69. Зависимость скорости течения элюента через колонку от гидравлического напора для биогелей серий А (а) и Р (б)

Сплошные линии — для гранул размером 100—200 МЕШ, пунктирные — 200—400 МЕШ



Максимально допустимые скорости элюции ($u_{\max}$) и соответственно максимальные гидравлические напоры (в виде отношения h/L ; см. рис. 68) для остальных типов матриц фирмы «Pharmacia» приведены ниже (в скобках — значения $u_{\max}$ для сефадексов категории «Superfine»):

Тип матрицы	h/L	$u_{\max}$, мл/см ² ·ч
<i>Сефадексы</i>		
G-100	3	50 (12)
G-150	1	23 (6)
G-200	0,5	12 (3)
<i>Сефарозы</i>		
6B	3	14
4B	2	11,5
2B	1	10
CL-2B	1,5	15

Зависимости скоростей течения элюента через колонки, заполненные относительно мягкими типами биогелей фирмы «Bio-Rad», от уровня гидравлического напора представлены на рис. 69. Конечный линейный участок каждой кривой соответствует началу сжатия геля, т. е. максимально допустимой скорости течения и соответственно максимальному гидравлическому напору. Сплошные кривые на рис. 69 приведены для размера гранул 100—200 МЕП. Гранулы размером 200—400 МЕП и —400 МЕП выдерживают заметно большие перепады давления, но скорость течения для таких мелких гранул (при одинаковых перепадах), естественно, меньше, чем для крупных. Биогели А50m и А150m оказываются настолько мягкими, что во избежание их сжатия было предложено заполнять колонки силиконизированными стеклянными шариками диаметром 5—6 мм и уже в промежутки между ними заливать суспензию гранул агарозы [Britten et al., 1974].

Аналогичные динамические характеристики для ультрогелей серии А представлены на рис. 70. Фирменными данными для матриц «Ultrogel AcA» мы не располагаем. Судя по его составу, следует проявлять осторожность при работе с ультрогелем AcA22 (2% агарозы и 2% ПААГ).

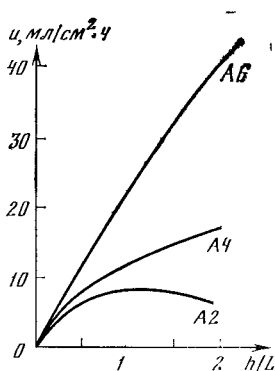


Рис. 70. Зависимость скорости течения элюента через колонку от гидравлического напора для ультрогелей серии А

ПРОВЕРКА КАЧЕСТВА ПАБИВКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ V_0

Через колонку пропускают раствор окрашенного и заведомо высокомолекулярного вещества. Часто для этой цели используют голубой декстран («Blue Dextran 2000») фирмы «Pharmacia» (мож-

но также использовать тушь). Его молекулярная масса (около 2×10^6) превышает предел исключения для большинства перечисленных выше матриц. 0,2%-ный раствор голубого декстрана, объем которого составляет 1—2% от объема колонки, вносят в рабочий буфере и элюируют с выбранной для опыта скоростью, наблюдая форму хроматографической зоны на всем пути ее следования по колонке. Искривление, перекося или негладкие границы окрашенной зоны указывают на несовершенство набивки колонки. В частности, искривление зоны, когда ее края отстают от средней части, может явиться результатом использования слишком жидкой суспензии при заливке: гранулы получают возможность в результате конвекционных токов жидкости распределиться по сечению колонки так, что наиболее крупные из них оказываются в середине. В очень тонких колонках искривление — почти неизбежное следствие торможения течения жидкости у стенок. Перекося зоны может быть обусловлен односторонним нагревом или охлаждением колонки во время заполнения, а также не строго вертикальным ее расположением. Неровные границы указывают на наличие крупных неоднородностей в набивке колонки, скорее всего — загрязнений и пузырей газа. Эти неоднородности и каналы нередко можно наблюдать на просвет, освещая колонку сзади лампой.

Следует пользоваться свежеприготовленным раствором голубого декстрана. При хранении молекулы голубого красителя постепенно отщепляются от декстрана и могут сорбироваться на материале матрицы. Одновременно с оценкой качества набивки пропускание через колонку голубого декстрана позволяет определить свободный объем колонки V_0 . Это можно осуществить и для крупнопористых гелей агарозы. Дело в том, что препарат голубого декстрана неоднороден. В нем имеются очень высокомолекулярные фракции, так что если ориентироваться по переднему, пусть слабее окрашенному, краю зоны, то можно сделать вполне корректную оценку значения V_0 . Зона в целом, разумеется, будет расплываться, но ее передняя граница должна оставаться четкой. Концентрацию исходного раствора декстрана в этом случае лучше увеличить до 0,5%.

ВНЕСЕНИЕ ПРЕПАРАТА

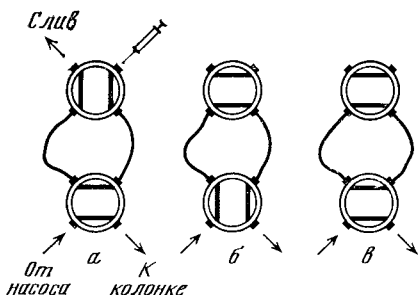
Тщательность выполнения этой операции при геле-фильтрации играет особую важную роль. Безусловное предпочтение следует отдать использованию адаптора. Следует убедиться в том, что адаптор без зазора прилегает к поверхности матрицы, и особенно внимательно следить за возможностью попадания воздушного пузырька в трубочку, ведущую к адаптору. Если это случится, следует прекратить подачу жидкости и вернуть пузырек в резервуар с препаратом путем изменения направления тока элюента через колонку на обратное. Для этой цели у перистальтических насосов предусмотрена возможность реверсии направления подачи жидкости при сохранении ее установленной скорости. Кстати говоря, насос удоб-

нее ставить на выходе колонки, а резервуар с препаратом или элюентом подсоединять к колонке как можно более короткой трубкой. Для внесения очень малых объемов препарата через адаптор можно с помощью двух кранов типа «SRV-4» (фирма «Pharmacia») и тонкой трубочки сконструировать инжекторную петлю по тому же принципу, который используется в инжекторах для ЖХВД. Способ присоединения и использования инжекторной петли ясен из рис. 71.

Если используется колонка без адаптора, то следует очень осторожно провести серию операций, описанных в гл. 3. Нанесение

Рис. 71. Внесение малого объема раствора препарата на колонку из петли с помощью двух кранов типа «SRV-4»

- а* — заполнение петли препаратом;
- б* — введение препарата в колонку;
- в* — рабочее положение элюции



ровного слоя препарата без взмучивания матрицы существенно облегчается, если на ее поверхность положить фильтр. Однако при этом следует иметь в виду возможность сорбции вещества на фильтре. При нанесении препарата вручную лучше пользоваться пипеткой с широким носиком или с наконечником из тайгоновой резинки, так как из тонкого кончика пипетки жидкость вытекает с большой скоростью. Фирма «Pharmacia» комплектует свои колонки специальным стаканчиком с нейлоновым фильтром вместо дна. Его опускают на поверхность матрицы. Препарат в стаканчик можно заливать быстро. Иногда препарат с повышенной плотностью (или даже добавив в него сахарозу) вносят из шприца или пипетки через трубочку под слой буфера на расстоянии 3—4 мм от поверхности матрицы. Перед внесением в кончик трубочки имеет смысл втянуть немного воздуха, чтобы препарат не смешивался с буфером в то время, как трубочка проходит через его слой. Этот воздух пузырьком выйдет из буфера вверх — в отличие от варианта с адаптором, где ему некуда выйти.

При повышении плотности раствора препарата следует помнить о нежелательном эффекте увеличения его вязкости. Это относится и к выбору исходной концентрации вещества в препарате. Чрезмерно высокая вязкость искажает форму зоны, даже зоны высокомолекулярной фракции, не говоря уже о затрудненности диффузии внутрь гранул. Вязкость препарата не должна более чем вдвое превышать вязкость элюента. Это можно проверить, сравнив времена истечения одинаковых объемов препарата и элюента из одной и той

же пипетки. Для водных элюентов и водных растворов белка указанному соотношению отвечает концентрация примерно 70 мг/мл.

Возможно и обратное: препарат очень разбавлен, и желательно его сконцентрировать. Если препарата мало, то во избежание потерь концентрирование можно провести в той же самой колонке. Поверх матрицы для гель-фильтрации можно нанести слой ионообменника, на который при низкой ионной силе весь препарат сорбируется. Затем начинают элюцию достаточно концентрированным раствором соли. Препарат снимается с ионообменника и в виде узкой зоны переходит в гель [Miller et al., 1976].

Еще раз следует подчеркнуть необходимость освобождения препарата от пыли и нерастворенных частиц путем центрифугирования или фильтрования. Желательно также убрать липиды и липопро-теиды, если они присутствуют в препарате, ввиду их склонности сорбироваться на геле. Если это сделать затруднительно, то имеет смысл препарат пропустить предварительно через короткую колонку с аналогичным, но мелкопористым гелем, который сорбирует липиды на себя.

В ходе длительной эксплуатации, даже при условии выполнения этих мер предосторожности, верхний слой столба матрицы в колонке может постепенно загрязниться. Его можно удалить так: взмутить верхние 1—2 см столба матрицы и отсосать суспензию с помощью водоструйного насоса. Затем следует дополнить колонку буфером или жидкой суспензией геля, взмутить еще небольшой слой матрицы и уравновесить колонку прокачкой буфера, как при первоначальном заполнении. Если загрязнена значительная часть матрицы, колонку лучше набить заново.

ПОДДЕРЖАНИЕ РАБОЧЕГО РЕЖИМА

Что касается самого хроматографического процесса, то контроль за ним сводится к поддержанию постоянства выбранной скорости элюции и сбору фракций. Соображения о выборе размеров колонки, объема препарата, типа элюента и скорости элюции даны в следующем разделе. Здесь, пожалуй, имеет смысл только упомянуть о технически своеобразном микроварианте гель-фильтрации с использованием центрифугирования. Наконечник эппендорфовой пипетки [Gorray, Quay, 1977] или баллончик пластикового шприца на 1 мл [Krauth, Werner, 1979] заполняют суспензией сефадекса G-25, закрыв отверстие кусочком стеклянной ваты. Эту «колонку» тем или иным способом закрепляют в центрифужной микропробирке (или пробирке) так, чтобы кончик не доставал дна. Центрифугированием в роторе с откидными стаканчиками при ускорении 1000g в течение 5—10 мин удаляют буфер из свободного объема между гранулами. Из самих гранул при таком ускорении буфер выходить не будет. Затем наносят слой препарата объемом около $\frac{1}{4}$ объема «колонки». Его можно заставить войти в обсушенный сефадекс центрифугированием с ускорением порядка 50g. Затем осуществляют элюцию центрифугированием — опять с уско-

рением 1000g. Проходя по «колонке», препарат отдает внутрь гранул соли или другие низкомолекулярные компоненты, а сам в прежнем объеме выходит в пробирку. Воздух в «колонке» здесь не мешает, так как жидкость выдавливается центробежной силой. Разумеется, метод предназначен только для сортировки молекул или обессоливания препарата, но зато занимает очень мало времени и позволяет манипулировать с объемами, измеряемыми десятками микролитров. Для аналитического фракционирования таких количеств препарата используют гель-фильтрацию в тонком слое (см. ниже).

РЕГЕНЕРАЦИЯ КОЛОНКИ

Ее осуществление обычно не требует других мер, кроме промывки буфером (2—3 объема колонки). Если есть опасение, что некоторое количество материала сорбировалось на матрице и не отмывается буфером, то через колонку можно пропустить порцию 1 М раствора NaCl, 8 М мочевины, детергента или, наконец, 0,5 н. NaOH для тех матриц, которые, как сефадексы или биогели Р, не боятся такой обработки. Об удалении загрязнения верхнего слоя колонки было сказано выше. При тщательном уходе колонки для гель-фильтрации могут служить в течение нескольких месяцев, даже года. Разумеется, в промежутках между опытами колонку следует уравновесить буфером с растворенным в нем консервантом, например 0,02%-ным раствором азида натрия. Колонки сефадекса можно сохранять в 2 М растворе NaCl. Сефадекс можно и высушить. Для этого его надо обильно промыть на фильтре сначала водой, потом 50%-ным и 96%-ным этанолом и высушить.

ВЫБОР ПАРАМЕТРОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

ВЫБОР МАТРИЦЫ

Этот выбор диктуется характером задачи, которая решается гель-фильтрацией, и свойствами разделяемых молекул, в первую очередь их массами. Для обессоливания раствора макромолекул естественно использовать жесткие, достаточно мелкопористые матрицы с крупными гранулами (последнее — для увеличения скорости течения), например сефадекс G-25 или биогель Р-6. Для обессоливания более мелких молекул можно воспользоваться сефадексами G-10 и G-15 или биогелями Р-2 и Р-4. Названные матрицы удобны и для смены буфера, в котором первоначально находится препарат, на тот, которым уравновешена колонка и производится элюция, или для освобождения биополимеров от радиоактивных низкомолекулярных предшественников. Близка к описанным и задача сортировки смеси на две группы веществ — высокомолекулярных и низкомолекулярных (например, отделение белков от пептидов или нуклеиновых кислот от белков). Здесь, очевидно, следует вы-

брать матрицу с пределом исключения, лежащим между теми значениями молекулярной массы, которые в данной задаче следует считать высокими и низкими. Если это возможно, то агарозные гели, сефакирил или хотя бы «Ultrogel AcA» в силу их большей жесткости следует предпочесть крупным номерам сефадексов или биогелей серии Р. Это позволит ускорить разделение групп — процесс, не предъявляющий высоких требований к установлению равновесия обмена между фазами.

Для хроматографического фракционирования смеси молекул, не сильно различающихся по своим массам, следует ориентироваться на линейный участок графика селективности, так чтобы для крайних значений молекулярных масс разделяемой смеси веществ значения K_{av} оставались в интервале 0,2—0,8. То же самое относится и к определению самих молекулярных масс методом гель-фильтрации. Впрочем, если это определение ведут в денатурирующем буфере (6 М раствор гуанидинхлорида), то надо учесть, что благодаря рыхлой упаковке денатурированных биополимеров вся область фракционирования смещается в сторону меньших значений молекулярных масс, чем те, которые приведены в таблицах для нативных глобулярных белков. Коррекцию на деформацию (и изменение размеров) белков следует вводить и в случае использования детергентов, применяемых для улучшения растворимости. Детергенты разворачивают белковые глобулы, увеличивая их эффективные размеры, и, кроме того, связываются с белками, что приводит иногда к заметному увеличению массы.

Нуклеиновые кислоты, даже однонитевые, имеющие структуру статистического клубка, упакованы заметно менее плотно, чем белки, поэтому для фракционирования их в заданном интервале молекулярных масс следует использовать более крупнопористые матрицы, чем для белков в том же интервале. Этот эффект намного сильнее выражен в случае жестких структур двунитевых нативных ДНК. Плотность упаковки макромолекул нуклеиновых кислот сильно зависит от концентрации соли в элюенте, которая нейтрализует электростатические силы отталкивания фосфатных групп.

Если для данного, не слишком широкого интервала молекулярных масс можно выбрать из нескольких матриц, графики селективности которых перекрывают этот интервал, то предпочтительно выбрать ту из них, для которой интервал K_{av} будет лежать ближе к пределу исключения (область малых значений K_{av}). Фракционирование займет меньше времени, а разрешение пиков от этого выиграет; кроме того, улучшатся условия для сохранения биологической активности. Ультрогели серии AcA, а также сефадексы и биогели серии Р средней и крупной пористости могут в этом плане оказаться наиболее подходящими матрицами, так как пределы исключения для них ниже, чем у других сефадексов и гелей агарозы.

Остается напомнить, что для аналитического фракционирования следует использовать гранулы наименьших возможных размеров (категорий «Fine» и «Superfine») для сефадексов, 200—400 МЕШ и —400 МЕШ для биогелей серии Р.

РАЗМЕРЫ КОЛОНКИ

Выбор длины и диаметра колонки определяется объемом препарата и задачей, стоящей перед гель-фильтрацией в данном опыте. При обессоливании, смене буфера и рассортировке молекул объем препарата может составлять 20—25 % полного объема колонки (V_t), чем и определяется выбор последнего. Что же касается отношения высоты колонки к ее диаметру, то оно может составлять 10 : 1 и ниже. Из стандартных колонок фирмы «Pharmacia», например, можно воспользоваться колонкой С 26/40. В лаборатории для этих целей нередко изготавливают еще более широкие и короткие колонки. С их помощью простые операции обессоливания или рассортировки молекул осуществляются быстро. Разбавление препарата при этом оказывается очень незначительным (на 10—20%), так как хроматографические зоны имеют протяженные «площадки» и расширение зон идет только за счет участков переднего и заднего фронтов.

При хроматографическом *фракционировании* молекул методом гель-фильтрации объем препарата не должен, по возможности, превышать 1—2% от объема колонки. В гл. 1 было показано, что решающая способность хроматографической колонки пропорциональна квадратному корню из ее длины. Отсюда понятно, почему для фракционирования используют длинные колонки (1—4,5 м и выше) с соотношением высоты к диаметру порядка 100 : 1. Исходя из этих соображений, по объему препарата можно выбрать объем колонки, а затем — ее длину и диаметр, ориентируясь на ассортимент готовых колонок с адапторами. Напомним, что колонка с двумя адапторами позволяет вести гель-фильтрацию в восходящем токе жидкости, когда и элюент, и препарат подают насосом с нижнего конца колонки. Для очень мягких гелей это позволяет несколько увеличить рабочую скорость элюции без риска смять материал матрицы. Впрочем, можно обойтись и одним адаптором: заполнить колонку и установить адаптор в нормальном положении (сверху), а потом колонку перевернуть.

ВЫБОР ЭЛЮЕНТА

Этот выбор определяется, в первую очередь, условиями растворимости и сохранности материала препарата. Эти соображения могут диктовать рН и ионную силу буфера, наличие в нем мочевины и детергентов. Однако надо иметь в виду и возможное воздействие выбора элюента на ход самого хроматографического процесса. Во-первых, такое воздействие может проявляться в изменениях конформации или плотности упаковки макромолекул, диссоциации белков на субъединицы, диссоциации кофакторов от ферментов и др. Во-вторых, следует проверить устойчивость материала матрицы к выбранному значению рН и диссоциирующим добавкам. Наконец, не следует упускать из виду возможности влияния элюента на взаимодействие разделяемых веществ с материалом матрицы, т. е.

принимать меры для защиты от сорбции (а иногда — для ее усиления), о чем было подробно сказано выше. Если впоследствии предполагается лиофилизировать препарат, то имеет смысл воспользоваться легко летучим буфером, например ацетатом или бикарбонатом аммония.

СКОРОСТЬ ЭЛЮЦИИ

Для обессоливания и рассортировки молекул скорость элюции может быть выбрана довольно большой — порядка $20 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$ (следует предварительно проверить сжимаемость геля!). Как было показано в гл. 1, с позиций достижения наилучшего разрешения пиков существует оптимальная скорость хроматографического фракционирования. Слишком медленная элюция приводит к резкому уширению пиков за счет продольной диффузии, слишком быстрая — к более постепенному их уширению за счет нарушения равновесия поперечной диффузии. Оптимальная скорость зависит от размеров молекул и гранул, увеличиваясь с уменьшением тех и других. Для ориентировки можно указать, что оптимальная скорость элюции для белков составляет примерно $2 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$ (для определения объемной скорости элюции это значение надо умножить на площадь сечения колонки). Однако нередко имеет смысл в интересах оптимизации условий эксперимента в целом значительно отступить от оптимальной скорости элюции в сторону ее увеличения.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПЕРИМЕНТА

Представим себе, что хроматографический опыт по гель-фильтрации проведен и мы можем проанализировать его результаты. При этом может оказаться, например, что некоторые пики едва разделены, но разрешение именно того пика, который нас интересует, оказалось избыточным. Напомним, что величина разрешения (R_s) представляет собой отношение «расстояния» между вершинами двух соседних пиков (в миллилитрах элюента или сантиметрах на ленте самописца — безразлично) к ширине пика у его основания. Разрешение считается приемлемым, если $R_s = 1$. Если R_s оказалось заметно больше единицы, то можно попробовать существенно увеличить скорость элюции, например в 10 раз. Пусть, например, при скорости элюции $2 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$ разрешение для пика нужного вещества оказалось равным 2,5. Увеличим скорость элюции до $20 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$. Эта цифра — отнюдь не чрезмерная: в гл. 1 упоминалось, что увеличение скорости элюции в 5 раз против оптимальной нередко не очень сильно ухудшает разрешение. Между тем, мы тем самым в 10 раз сократим время элюции. Пики, конечно, несколько расширятся, препарат разбавится, но если это допустимо, то выигрыш времени всегда желателен. Предположим теперь, что разрешение все еще больше единицы (например, для новой скорости элюции $R_s = 1,5$). Вспомним (см. гл. 1), что разрешение пропорционально

квадратному корню из длины колонки L . Тогда, если мы от колонки длиной L_1 при сохранении всех прочих условий хроматографии перейдем к колонке длиной L_2 , то последнюю величину можно считать так:

$$\frac{\sqrt{L_2}}{\sqrt{L_1}} = \frac{R_{s_2}}{R_{s_1}}; \quad L_2 = L_1 \frac{R_{s_2}^2}{R_{s_1}^2}.$$

В нашем случае $R_{s_1} = 1,5$. Если мы готовы довольствоваться минимально приемлемым разрешением ($R_s = 1$), то $L_2 = L_1/2,25$, т. е. длину колонки можно уменьшить более чем вдвое и все же хорошо отделить интересующее нас вещество. Таким образом, оптимизация позволила от таких исходных параметров, как $L = 1$ м, $v = 2$ мл/см²·ч, перейти к новым, оптимальным параметрам разделения: $L = 45$ см, $v = 20$ мл/см²·ч. Выигрыш во времени и экономия материала матрицы очевидны.

В заключение добавим, что разбавление исходной зоны препарата при аналитическом фракционировании методом гель-фильтрации в 3—5 раз является вполне нормальным, особенно для фракций, выходящих последними.

ОЧИСТКА И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛ

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ

Обессоливание, смена буфера, очистка от радиоактивных предшественников

Обессоливание и смена буфера с помощью гель-фильтрации широко используются в ходе очистки белков и пептидов для освобождения от сульфата аммония или в качестве промежуточной операции, подготавливающей препарат к последующему этапу хроматографии (ионообменной, аффинной или других видов). Если объем раствора белка измеряется миллилитрами, то рутинную операцию его очистки нередко ведут «вслепую». Однажды откалибровав небольшую колонку с сефадексом G-25, последующий отбор фракций, содержащих высокомолекулярные компоненты, производят по объему элюата, нередко просто путем отсчета капель. Соотношение объемов исходного раствора и колонки в этом случае может составлять примерно 1 : 10. В препаративных вариантах обессоливания, когда желательно максимально использовать объем колонки и избежать разбавления препарата, это соотношение можно увеличить до 1 : 3, контролируя выход хроматографических зон по УФ-поглощению. Скорость элюции в таких опытах может быть значительной, порядка 20 мл/см²·ч (скорость продвижения фронта зоны очищаемого вещества по колонке — 20 см/ч).

На рис. 72 в качестве иллюстрации показан профиль хроматографической элюции при обессоливании гемоглобина [Mikeš, 1979]. 400 мл раствора гемоглобина (1 мг/мл) в 0,2 М NaCl вносили на колонку сефадекса G-25 размером 4×85 см ($V_t = 1070$ мл). Таким образом, препарат занимал 37% полного объема колонки. Элюцию вели со скоростью 240 мл/ч, что составляло $19 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$. Как видно из рисунка (сплошные линии), зоны гемоглобина и соли соприкасаются, но 99% материала в зоне гемоглобина совершенно свободны

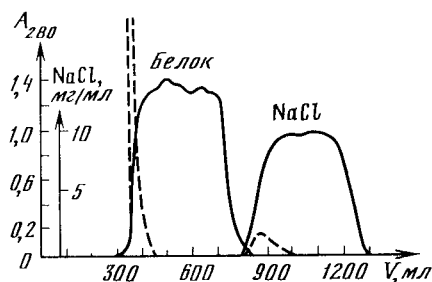


Рис. 72. Обессоливание гемоглобина в препаративном (сплошные линии) и аналитическом (пунктир) вариантах загрузки колонки

от соли. По оси абсцисс легко подсчитать, что объем раствора гемоглобина в ходе очистки практически не увеличился. Для сравнения на том же рисунке пунктиром показан вариант обессоливания при аналитическом соотношении объемов препарата и колонки. 10 мл раствора гемоглобина (10 мг/мл) вносили в том же буфере и элюировали с той же скоростью. Теперь пики гемоглобина и NaCl далеко отстоят друг от друга, но при этом раствор гемоглобина оказался разбавленным более чем в 10 раз.

Использование гель-фильтрации для освобождения от радиоактивных предшественников неоднократно цитировалось при описании методов введения радиоактивной метки в белки и нуклеиновые кислоты [Остерман, 1983]. Нередко «обессоливание» используют и на заключительном этапе очистки для освобождения не только от соли, но и от прочих низкомолекулярных примесей. Например, в одной из работ по выделению РНК-полимеразы очисткой белка на биогеле А-1,5м завершалась целая серия операций, включавшая различные варианты переосаждений белка и ионообменной хроматографии [Vaisius, Norgel, 1979].

Особый случай представляет собой отделение белка от свободного детергента. Здесь следует помнить о том, что при концентрациях выше некоторых критических детергенты в водном растворе существуют в виде мицелл, достаточно крупных для того, чтобы не проникать в поры, например сефадекса G-25. Например, мицеллы додецилсульфата натрия (ДДС-Na) содержат до 70 молекул, т. е. имеют суммарную молекулярную массу около 20 000. Мицеллы Тритона X-100 еще крупнее — до 120 молекул с суммарной массой около 75 000. Критическая концентрация мицеллообразования для ДДС-Na в 0,01 М NaCl составляет 0,3%, а для Тритона X-100 — 0,06%. Это означает, что отделить от детергентов гель-фильтрацией можно только очень крупные белки на крупнопористых матрицах. К счастью, в случае ДДС-Na проблему можно разрешить, воспользовавшись резким падением его растворимости при понижении температуры. Охлаждением препарата до 0° основную массу

ДДС-Na можно перевести в осадок; при этом его концентрация в растворе падает до 0,25 %, что меньше критической концентрации мицеллообразования при комнатной температуре в указанном солевом растворе (при увеличении содержания соли концентрация мицеллообразования сильно снижается). Растворенный в мономерной форме ДДС-Na легко отделяется от белка на сефадексе G-25. С другой стороны, как уже упоминалось, связанные с белком детергенты могут очень существенно увеличить размеры и молекулярную массу комплекса, что следует иметь в виду при выборе пористости геля.

Отмеченное обстоятельство можно использовать для отделения методом гель-фильтрации белков, имеющих на своей поверхности обширные гидрофобные области. Таким образом, например, Вассали и соавторы обнаружили различие между IgM, находящимися на поверхности лимфоцитов и циркулирующими в крови. Оказалось, что первый тип IgM имеет гидрофобную область, вероятно, обеспечивающую его связь с мембранами. Разделение вели на колонке сефарозы 6В, уравновешенной буфером с добавкой 0,5% неионного детергента NP-40 [Vassali et al., 1979]. Полезно упомянуть о том, что методом гель-фильтрации в простом варианте сортировки молекул белок иногда можно очищать не от низкомолекулярных примесей, а наоборот — от более высокомолекулярных. Именно таким способом Венерт отделил ДНК-полимеразу I от ДНК. Гель-фильтрацию он проводил уже на первом этапе очистки фермента из лизата бактерий, используя колонку биогеля А-0,5 m, уравновешенную буфером, содержащим 1 M NaCl. Высокая концентрация соли обеспечивала диссоциацию фермента от ДНК [Wähner, 1981].

Обессоливание пептидов гель-фильтрацией на мелкопористых матрицах — возможно, но следует учитывать опасность задержания на них пептидов с повышенным содержанием гидрофобных аминокислотных остатков (у белков остатки гидрофобных аминокислот в большинстве случаев спрятаны внутри глобулы). Некоторые из таких пептидов даже плохо растворяются в водных буферах. Это обстоятельство было недавно использовано для фракционирования пептидов на колонке сефадекса G-15 «Superfine» в смеси 70% пиридина и 30% 1 M NH_4OH [Casey, Rees, 1979]. Однако такое разделение происходило, по-видимому, по механизму распределительной хроматографии, а не гель-фильтрации.

Хроматографическое фракционирование

Фракционирование белков методом гель-фильтрации используется довольно редко, очевидно, ввиду низкой (по сравнению с другими хроматографическими методами) эффективности, присущей самому процессу (см. выше). Однако в тех случаях, когда число компонентов белковой смеси заведомо невелико, такое фракционирование может оказаться вполне эффективным приемом. Так, четыре главных белка вируса рака молочной железы мышей были успешно разделены по молекулярной массе методом гель-фильтрации их ком-

плексов с ДДС-Na на относительно короткой (80 см) колонке сефадекса G-200 в буфере, содержавшем 1% ДДС-Na. Детергент заодно служил и для предварительного вскрытия вирионов при температуре 50° [Dion et al., 1977].

В присутствии ДДС-Na на одной колонке можно разделять гидрофобные и гидрофильные белки [Schreus et al., 1983]. Следует, однако, помнить, что гидродинамические размеры белков в этом случае сильно увеличиваются как за счет связывания молекул детергента, так и вследствие распрямления полипептидных цепей. В цитируемой работе белки с молекулярной массой от 18 000 до 330 000 предварительно денатурировали обработкой 6%-ным раствором ДДС-Na с 1% β -меркаптоэтанолом в течение 1,5 ч при 60°, а затем фракционировали на колонке сефакрила S-400 (2,6 $\times$ 94 см). Элюцию вели 0,09 М Трис-боратным буфером (pH 8,35) в присутствии 0,2% ДДС-Na и 2,5 мМ ЭДТА. График селективности колонки для такого варианта разделения, построенный по истинным значениям молекулярной массы белков, определенным электрофорезом, идет значительно ниже (примерно на 0,4 ед. K_{av}), чем фирменный график для нативных глобулярных белков.

Чаще используется не фракционирование, а хроматографическая очистка белка. Ее особенность заключается в том, что осуществляется максимально возможная «разгонка» исходной белковой смеси по колонке, причем так, что интересующий экспериментатора белок оказывается где-то в середине последовательности выходящих из колонки белков смеси. Его обнаруживают по каким-либо физиологическим особенностям, например по ферментативной активности, и, примирившись с потерями, обусловленными неполным разделением белковых пиков, отбирают наиболее обогащенные нужным белком фракции элюата. Так удается в одной хроматографической операции освободиться и от более крупных, и от более мелких примесных белков. В качестве примера можно указать недавнюю работу по выделению аргининсукциназы из мозга быка, где на заключительной стадии очистки была использована повторная гель-филтрация на колонке с биогелем А-0,5m (молекулярная масса аргининсукциназы — 202 000) в 0,06 М фосфатном буфере, pH 7,5 [Murakami-Murofushi, Ratner, 1979].

Иногда для фракционирования приходится использовать очень длинные колонки. Так, для очистки одного из щелочных негистоновых белков из ядер тимуса (не принадлежащего к НМГ-группе белков) после экстракции хроматина 0,2 М H_2SO_4 , освобождения его от нуклеиновых кислот и кислых белков на катионообменной колонке и удаления гистона H1 и НМГ-белков экстракцией 0,75 М $HClO_4$ оставшийся материал фракционировали на колонке с биогелем Р-60 длиной 3 м. На рис. 73, А показана картина распределения хроматографических зон, отмечены положения отдельных гистонов и заштрихована область выхода нужного белка (тестирование по электрофорезу). Материал из этой области вносили для повторной хроматографии на еще более длинную колонку того же геля (4,2 м). На этот раз искомый белок выходил четким пиком

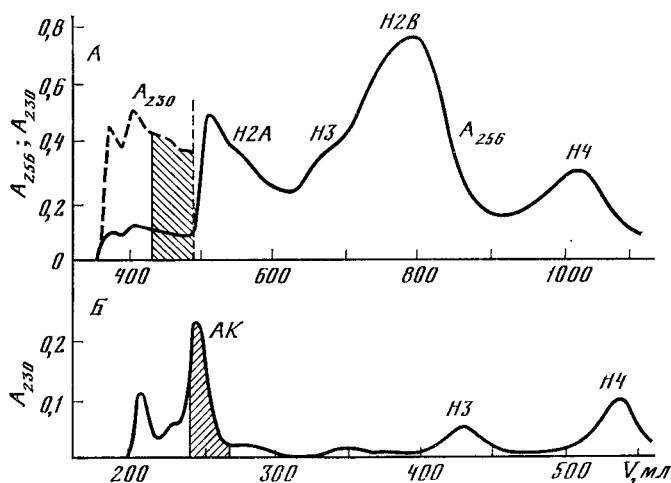


Рис. 73. Двухступенчатая очистка одного из негистоновых щелочных белков хроматина тимуса («белок AK») методом гель-фильтрации на биогеле Р-60

А — первая ступень очистки на колонке размером $2,5 \times 300$ см; Б — вторая ступень очистки на колонке размером $1,5 \times 420$ см; на вторую колонку вносили материал из заштрихованной области профиля элюции первой колонки

(рис. 73, Б) [Jenson et al., 1980]. Приведенный пример является своего рода рекордом, поскольку манипулировать с колонкой четырехметровой длины (при диаметре 1,5 см) вряд ли найдется много желающих, но он иллюстрирует необходимость существенного увеличения длины колонки в случае постановки перед методом фракционирования белков гель-фильтрацией более сложных задач. В свете этого обстоятельства вызывает особый интерес возможность использования для гель-фильтрации ЖХВД с присущей ей повышенной эффективностью разделения.

В этом разделе были высказаны общие соображения и приведены примеры, относящиеся к очистке и фракционированию нативных белков. Полная денатурация белков производится при оценке их молекулярной массы методом гель-фильтрации. Особенности хроматографии денатурированных белков рассмотрены ниже, в соответствующем разделе.

БЕЛКОВО-НУКЛЕИНОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Накоплен большой опыт использования гель-фильтрации для очистки рибосом, полисом и ферментов, участвующих в биосинтезе белка и образующих комплексы с нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, а также аминокислотами. Например, при исследовании аминокислотирования тРНК для отделения аминокислот-аминоацил-тРНК-синтетаз и их комплексов с АТФ и аминокислотами от свободных ами-

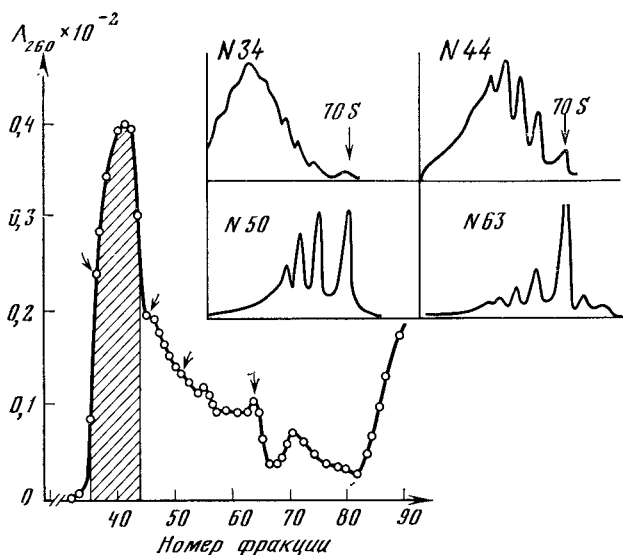


Рис. 74. Препаративная очистка полисом *E. coli* на колонке сефарозы 4В (см. текст)

нокислот и нуклеозидтрифосфатов уже давно используют гель-фильтрацию на сефадексах G-25 и G-50, а комплексы синтетаз с тРНК от свободных молекул тРНК отделяют на сефадексах G-100 и G-200 [J. Allende, C. Allende, 1971]. Сейчас для этой цели удобнее пользоваться более жесткими современными гелями такой же пористости.

Очистка рибосом на сефадексе G-200 от аминоксил-тРНК и рибонуклеаз была описана еще в конце 60-х годов [Takamami, 1967; Arlinghaus et al., 1968]. Недавно была подробно описана быстрая препаративная очистка рибосом из 50 г пасты *E. coli* на колонке сефарила S-200 (3 × 100 см) в буфере, содержавшем, помимо прочих компонентов, 1 М NH_4Cl и 5 мМ Mg^{2+} . Очистка занимала 1 ч, рибосомы выходили четким пиком в свободном объеме колонки — их обнаруживали по мутности элюата [Jelenc, 1980].

Препаративную очистку полисом из 3—5 мл лизата *E. coli*, обработанного ДНКазой, проводили на колонке сефарозы 4В (2,5 × 33 см; $V_t = 165$ мл). В элюенте присутствовало 10% глицерина, и скорость элюции была снижена до 4—5 мл/см²·ч. На рис. 74 представлен профиль элюции. В заштрихованной области выходят очищенные полисомы, во фракции 63 — рибосомы, а в промежутке между ними обнаруживаются в различных пропорциях смеси чистых рибосом с комплексами, содержащими 2—3 рибосомы [Tai, Davis, 1979].

Обессоливание, смену буфера и очистку нуклеиновых кислот (НК) от радиоактивных предшественников производят также, как для белков. Выбор пористости геля диктуется молекулярными размерами примесей, от которых очищают раствор НК. Как и для белков, здесь можно использовать мелкопористые и достаточно жесткие гели типа сефадекса G-25, биогель Р-6 и сходные с ними.

Возможность разбиения НК на небольшое число классов или групп, резко отличающихся друг от друга по размерам, позволяет осуществлять их сортировку и фракционирование методом гель-фильтрации. В первую очередь это относится к разделению ДНК и РНК. Еще в 1975 г. Луркин и соавторы использовали гель-фильтрацию для очистки ДНК растительного происхождения от РНК и пигментов. Растительные клетки вскрывали в 1,5%-ном растворе саркозила, лизаты обрабатывали пропанозой, а затем добавляли NaCl до концентрации 2 М. Колонку сефарозы 4В (2,5 × 40 см) уравнивали в таком же крепком солевом растворе, вносили на нее лизат и этим же раствором элюировали. ДНК выходила в свободном объеме, полностью очищенной от РНК и содержащей не более 2% примеси белка. Высокая концентрация соли здесь, по-видимому, обеспечивала диссоциацию от ДНК всех связанных с нею белков и новосинтезированной РНК [Lurquin et al., 1975]. Воспользуемся случаем напомнить, что концентрация соли играет особую роль в осуществлении гель-фильтрации НК, определяя их конформацию и упаковку, которая при увеличении концентрации соли становится более компактной. Напомним также, что даже в присутствии соли макромолекулы НК упакованы более рыхло, чем белки, и это надо учитывать при выборе пористости геля.

Авторы цитируемой работы не упоминают о степени вязкости исходного препарата, что в случае внесения на колонку непосредственно клеточного лизата представляет интерес, тем более что элюцию вели с довольно большой скоростью — около 12 мл/см²·ч. В случае растворов ДНК с нежелательным эффектом вязкости всегда приходится считаться, выбирая концентрацию ДНК в исходном препарате в соответствии с приведенными выше рекомендациями (см. раздел «Внесение препарата»).

Рассмотрим теперь совсем недавний пример разделения ДНК и РНК. Здесь решалась более тонкая задача разделения НК, соизмеримых по своим размерам, а именно очистки ДНК плазмиды рВВ 322 от примеси РНК. Присутствие РНК в препаратах плазмидной ДНК мешает протеканию некоторых ферментативных реакций и затеняет результаты введения концевой радиоактивной метки. Оказалось, что даже интенсивная обработка РНКазой (50 мкг/мл, 37°, 1 ч) не расщепляет РНК полностью, а лишь дробит ее на фрагменты, не обнаруживаемые электрофорезом в 1%-ном геле агарозы (они уходят вперед), но переосаждающиеся этанолом вместе с плазмидной ДНК. Кроме того, обработка РНКазой вообще нежелательна. Несмотря на предварительный прогрев, в ней остается небольшая

ДНКазная активность, вызывающая разрывы в ДНК плазмиды (возможно, что разрывы происходят по коротким вставкам РНК в молекулах ДНК, но это не меняет дела). ДНК плазмиды очищали, как обычно, центрифугированием просветленного лизата и ультрацентрифугированием в градиенте CsCl с иодистым пропицидом, потом удаляли последний многократной экстракцией бутанолом. ДНК дважды пересаждали подкисленным этанолом и в конце концов получали препарат, содержащий, помимо плазмидной ДНК, от

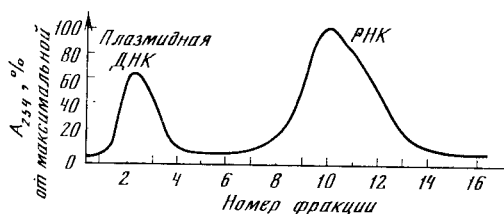


Рис. 75. Очистка плазмидной ДНК от РНК гель-фильтрацией на колонке сефакрила S-300

10 до 50% РНК. Этот препарат (8 мг в объеме 2—4 мл) загружали на колонку сефакрила S-300 (2,5 × 30 см) и элюировали 0,01 М трис-буфером, pH 7,6, содержащим 0,2 М NaCl и 0,5 мМ ЭДТА. Благодаря жесткости матрицы элюцию можно было вести со скоростью 20 мл/см²·ч, но тем не менее ДНК pBR 322 легко отделялась от РНК, как хорошо видно на рис. 75, где, очевидно, показан только тот участок хроматограммы, где выходят обе НК [Norgard, 1981].

Еще более крупнопористую жесткую матрицу — сефакрил S-1000 — недавно было предложено использовать для быстрой препаративной очистки ДНК плазмид от примеси ДНК бактериофага. Последняя при гель-фильтрации на указанной матрице выходит на переднем фронте высокомолекулярного пика ДНК, и ее можно отбросить. РНК в этом случае предварительно переваривали РНКазой [Bywater et al., 1983].

Бакаев и соавторы отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-150 гибриды ДНК—РНК от не вошедшей в гибридный комплекс ДНК. В этом случае в гибридизации участвовали крупные молекулы пре-мРНК, выделенные из ядер горячим фенолом, и короткие фрагменты ДНК из субнуклеосом длиной в 25—30 нуклеотидов. Последние задерживались гелем, в то время как гибридный комплекс благодаря наличию мРНК выходил в свободном объеме колонки [Bakayev et al., 1979].

Персон и соавторы отделяли гель-фильтрацией гибрид ДНК—РНК от не включившейся в него РНК. В качестве «низкомолекулярного» партнера фигурировала суммарная РНК из клеток HeLa, зараженных аденовирусом. Ее гибридизовали с высокомолекулярной ДНК аденовируса. Естественно, что в этом случае для отделения РНК пришлось использовать весьма крупнопористый гель — сефарозу 2В. Колонка размером 0,9 × 20 см была уравновешена и элюировалась 0,05 М Трис-HCl, pH 7,9, содержащим 0,5 М LiCl, 0,5% ДДС-Na и 1 мМ ЭДТА. Препараты вносили прямо в гибриди-

зационном буфере, в состав которого, помимо прочих компонентов, входил и формамид (50%). Для определения свободного объема такой колонки добавляли немного радиоактивно меченной ДНК [Person et al., 1979].

Росбах и соавторы в 70%-ном формамиде образовывали гибриды двунитевой плазмидной ДНК и РНК («Р-петли»). Аналогично предыдущему, эти гибриды очищали от не включившейся РНК гелевой фильтрацией на еще более крупнопористом геле агарозы — биогеле А-150m [Rosbach et al., 1979].

Совсем в другом масштабе размеров молекул с помощью гелевой фильтрации решается проблема разделения двух низкомолекулярных РНК, а именно рибосомальной 5S РНК и тРНК. Для этой цели был успешно использован сефадекс G-100 в длинной колонке (2×160 см), на которую вносили до 200 мг низкомолекулярной РНК. В целях компактной упаковки и предотвращения агрегации элюент содержал 1 М NaCl [Sabol, Ochoa, 1974].

Наконец, отметим возможность быстрой и эффективной очистки гелевой фильтрацией целых вирусов и фагов. Например, в недавней работе из 1 л суспензии *E. coli*, зараженных фагом λ , после обработки бактериального лизата ДНКазой, РНКазой и концентрирования фагов переосаждением полиэтиленгликолем ПЭГ-6000 за одну операцию гелевой фильтрации на колонке биогеля А-5m объемом 125 мл удавалось полностью очистить до 65% инфекционного материала [Sain, Erdei, 1981].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БЕЛКА

Гелевую фильтрацию широко используют для определения молекулярных масс биополимеров, особенно белков. Чем меньше белок, тем больше объем элюции его с колонки (V_R); это, как мы видели, — основной закон гелевой фильтрации. Графики селективности ясно указывают на наличие линейной связи между логарифмом молекулярной массы белка ($\log M$) и величиной K_{av} (или K_d) в определенном интервале значений M для каждого типа геля. Казалось бы, задача этим решается. Достаточно определить в эксперименте значение K_{av} для данного белка — и с помощью фирменного графика селективности можно будет найти $\log M$, а следовательно, и M . Если довольствоваться весьма приближенным результатом, то можно так и поступить. Однако при более пристальном изучении этой проблемы с целью получить относительно точные значения M она оказывается значительно сложнее. Прежде всего, фирменные графики селективности носят ориентировочный характер, и для разных партий одного и того же геля истинные зависимости $\log M$ от K_{av} отличаются друг от друга. Это можно обойти, если построить самому такой график (калибровочную прямую) с помощью набора белков известной массы. Но тут-то и возникает главная трудность. Какие белки выбрать для такого построения? Ответа на этот вопрос поищем сначала для случая нативных белков.

НАТИВНЫЕ БЕЛКИ

Еще в 1966 г. Зигель и Монти описали весьма примечательные результаты сопоставления характера миграции по колонке сефадекса G-200 размером 3×48 см ($V_t = 340$ мл) серии белков с известной молекулярной массой. Элюцию вели 0,04 М Na-фосфатным буфером, объем препарата 1,5 мл. Эти результаты таковы [Siegel, Monty, 1966]:

Белок	V_R , мл	K_d	М, тыс. Дальтон	α , Å	f/f_0
Фибриноген	88	0,03	330	107	2,34
Ферритин	109	0,11	1300	79	1,14
Уреаза	132	0,2	483	61	1,19
Каталаза	148	0,26	250	52	1,25
Бычий сывороточный альбумин	191	0,43	65	35	1,30
Цитохром с	284	0,8	12	17	1,09

О двух последних столбцах речь пойдет ниже, а пока рассмотрим цифры, находящиеся в трех первых столбцах. Белки расположены в порядке увеличения объемов элюции (V_R) — соответственно увеличиваются и значения K_d . Следовало бы ожидать, что в этом же порядке будут уменьшаться молекулярные массы (M) белков, однако это не так. Фибриноген выходит из колонки первым, для него $K_d = 0,03$, т. е. намного меньше, чем для ферритина и уреазы, а между тем его молекулярная масса не больше, а меньше, чем у этих двух белков. Оставим в стороне ферритин — особый белок, в состав которого входит железо. Плотность ферритина $\rho = 1,7$, в то время как для подавляющего большинства «нормальных» белков $\rho = 1,38$. Но как объяснить несоответствие между значениями K_d и M для фибриногена и уреазы? K_d фибриногена почти в 7 раз меньше, чем уреазы, а молекулярная масса его не больше, а в 1,5 раза меньше. Похоже на то, что «основной закон» гель-фильтрации («чем меньше белок, тем больше V_R ») нарушается.

Однако это не так. Дело в том, что под словом «меньше» мы не вправе подразумевать молекулярную массу белка, а должны оценивать тот параметр, который действительно определяет возможность проникновения белка в поры геля, — его молекулярные размеры. Но если плотности всех нативных белков (за немногими исключениями) почти одинаковы, то их размеры, а точнее объемы, должны быть пропорциональны массам. Это верно, но остается еще один фактор, играющий в этом рассмотрении ключевую роль, — форма молекулы. Белковая глобула может быть почти шаром, а может напоминать палочку, поэтому ее поведение при гель-фильтрации (способность проникать в поры геля) будет совершенно различным в этих двух случаях. Но можно ли составить представление о форме молекулы белка, если не рассматривать ее (в нативном состоянии!)

с помощью электронного микроскопа? Оказывается, можно, причем как раз опираясь на поведение молекулы в растворе, на ее гидродинамические свойства. Здесь нам придется сделать небольшое отступление и познакомиться с величиной, которая характеризует размеры и форму молекулы, т. е. именно те параметры, которые играют решающую роль в гель-фильтрации. Эта величина называется «стоксовым радиусом» молекулы.

Известен точный физический закон, описывающий движение частицы сферической формы в вязкой жидкости — закон Стокса:

$$F_T = 6\pi R\eta v. \quad (31)$$

Здесь F_T — сила трения, действующая на частицу, R — радиус сферы, η — коэффициент вязкости среды и v — скорость движения частицы.

Если в вязкой среде движется частица несферической (или даже вообще неправильной) формы, то, как показывают точные физические измерения, сила трения, действующая на такую частицу, все равно оказывается прямо пропорциональной коэффициенту вязкости среды и скорости движения частицы. Эту пропорциональность можно записать так:

$$F_T = 6\pi a\eta v. \quad (32)$$

Здесь в форме $6\pi a$ записан некий коэффициент пропорциональности, характеризующий динамические свойства (т. е. размер и форму) данной частицы. Мы могли бы обозначить этот коэффициент одной буквой, но для сопоставления с формулой (31) имеет смысл ввести в состав коэффициента пропорциональности неизменный множитель 6π . Проведя такое сопоставление, мы вправе утверждать, что интересующая нас частица будет двигаться в вязкой жидкости точно так же, как сферическая частица с радиусом a — по крайней мере, в том смысле, что при движении со скоростью v эта «эквивалентная сфера» будет испытывать действие точно такой же силы трения F_T , как наша частица. Величину a и называют «стоксовым радиусом» для данной частицы. Это — динамическая характеристика размера и формы частицы (в нашем случае — макромолекулы белка).

В том, что эта характеристика связана именно с формой, а не с объемом частицы, нас может убедить следующее рассуждение. Очевидно, что сила трения зависит от площади поверхности движущейся частицы, а при данном объеме наименьшей поверхностью обладает именно шар. Чтобы в этом убедиться, вспомните, что попытка смять надутый воздушный шарик пальцами стоит некоторых усилий — при нарушении формы шара резина должна дополнительно растянуться. Отсюда, в частности, следует, что стоксов радиус белковой молекулы продолговатой формы больше, чем радиус сферической макромолекулы того же объема. Продолговатая молекула с точки зрения гидродинамики будет вести себя как сферическая молекула большего радиуса (т. е. большей массы).

Связь между стоксовым радиусом молекулы a и ее молекулярной массой M можно установить из опыта по седиментации молекул в ультрацентрифуге. Центробежная сила $F_{\text{ц}}$, действующая на молекулу, равна

$$F_{\text{ц}} = m (1 - \rho/\rho_m) \omega^2 r. \quad (33)$$

Здесь m — масса молекулы в граммах (ее можно выразить через молекулярную массу и число Авогадро N : $m = M/N$), ρ_m — плотность материала частицы, ρ — плотность среды, ω — угловая скорость вращения ротора и r — расстояние частицы от оси вращения [Остерман, 1981]. В пробирке центрифуги молекула движется со скоростью, отвечающей равенству сил ($F_{\text{ц}} = F_{\text{т}}$). Приравняв выражения (32) и (33) и введя величину коэффициента седиментации $s = v/\omega^2 r$, получим следующее соотношение:

$$M = a \frac{6\pi\eta Ns}{1 - \rho/\rho_m}. \quad (34)$$

Эта формула показывает характер связи между массой белковой молекулы и ее стоксовым радиусом. Существует набор белковых молекул, для которых точно определены значения стоксовых радиусов. Такой набор, как мы увидим, можно использовать для построения калибровочных кривых при гель-фильтрации нативных белков.

В предпоследнем столбце (см. выше) приведены стоксовы радиусы белков. Легко видеть, что они убывают в том же порядке, как увеличиваются значения K_d . Для этих радиусов «основной закон» гель-фильтрации выполняется. Однако простой зависимости между величинами a и M при гель-фильтрации предложить еще нельзя. Необходимо учесть еще один параметр — форму белковой глобулы. При движении в свободной жидкости молекулы разной формы, но с одинаковыми стоксовыми радиусами, эквивалентны, но с позиций проникновения в поры геля это не так.

Не имея представления об истинной форме молекулы, мы все же можем охарактеризовать степень ее отклонения от сферической отношением a/R , где R — истинный радиус сферической молекулы такой же массы, как интересующая нас молекула. Выражения (34) и (32) можно записать в общем виде: $F_{\text{т}} = fv$ (где f — коэффициент трения). Для макромолекулы сферической формы $f_0 = 6\pi R\eta$, а для молекулы произвольной формы $f = 6\pi a\eta$. Очевидно, что $a/R = f/f_0$. Отношение f/f_0 характеризует отклонение формы молекулы от сферической. Мы можем условиться для краткости называть это отношение «коэффициентом формы».

Рассматривая последний столбец, можно высказать предположение, что ненормальное поведение молекул фибриногена при гель-фильтрации обусловлено исключительно большим значением их коэффициента формы. Молекулы фибриногена вытянуты в «палочки» («глобулярными» называют белки, для которых $f/f_0 < 1,3$). Свободно диффундирующая под действием броуновских сил «палочка» с трудом проникает в поры геля, постоянно «цепляясь» за нити

образующего их полимера. Впрочем, это зависит от того, какое время будет предоставлено для такой диффузии, т. е. от времени установления равновесия между хроматографическими зонами, или, иными словами, от скорости элюции. Недавно было показано, что сильно асимметричные белки типа коллагена и фибриногена способны проникать в поры, соизмеримые с малой осью очерчивающего их контур эллипсоида, т. е. ориентироваться по порам. Однако скорость такого проникновения очень мала [Meredith, Nathans, 1982].

Вернемся к реальной ситуации гель-фильтрации. Объем сферической молекулы (V) можно выразить через ее радиус или через массу и плотность:

$$V = \frac{4}{3} \pi R^3 = \frac{M}{N \rho_m}.$$

Отсюда

$$R = \left(\frac{3M}{4\pi N \rho_m} \right)^{1/3}.$$

Тогда

$$f/f_0 = \frac{a}{\left(\frac{3M}{4\pi N \rho_m} \right)^{1/3}}.$$

Следовательно, между массой молекулы и ее стоксовым радиусом существует зависимость:

$$M = \frac{4\pi N}{3} \frac{\rho_m}{(f/f_0)^3} a^3. \quad (35)$$

Из этой зависимости следует, что интерполяцию по стоксовым радиусам молекул, которую можно осуществить, пользуясь методом гель-фильтрации и соответствующей калибровочной кривой, мы не вправе заменять интерполяцией по массам молекул до тех пор, пока не будем уверены в том, что для исследуемой белковой молекулы и всех молекул, использованных для калибровки, выполняется условие одинаковой плотности и одинаковой формы молекул, т. е. равенства отношения f/f_0 . Даже если откинуть фибриллярные белки типа фибриногена, коэффициент формы f/f_0 варьирует достаточно заметно (сравним цифры для БСА и цитохрома с), и это тем более существенно, что отношение f/f_0 в формулу (35) входит в третьей степени.

Зависимость величин K_{av} и K_d от стоксова радиуса молекул исследовалась неоднократно. Было найдено, что эту зависимость можно выразить следующими линейными приближениями: $(K_d)^{1/3} = \alpha - \beta a$ [Porath, 1963]; $(-\log K_{av})^{1/2} = \alpha' - \beta' a$ [Laurent, Killander, 1964]. Это сильно упрощает дело. Коэффициенты α , β и α' , β' можно не определять, а по двум белкам с известными значениями a построить линейные графики такого вида, как показаны на рис. 76. С их помощью для исследуемого белка по найденному в эксперименте значению K_{av} или K_d легко найти стоксов радиус, по которому

из формулы (34) можно подсчитать массу белка. Для этого придется определить еще его коэффициент седиментации в такой же среде, какая была использована при гель-фильтрации. Впрочем, если последнюю проводили в водном буфере при температуре около 20° и из литературы известна константа седиментации белка $S_{20,w}$ (в единицах Сведберга), то коэффициент седиментации можно подсчитать так: $s = S_{20,w} \cdot 10^{-13}$ (с). Значение ρ_m для большинства белков, как указывалось, близко к 1,38 г/см³; для воды $\rho = 1$ г/см³, а $\eta \approx 0,01$ пуаз. Число Авогадро $N = 6,02 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹. Стоксов радиус в формулу (34) следует подставить в сантиметрах, для чего значение a в ангстремах надо умножить на 10^{-8} . Например, константа седиментации для каталазы известна: $S_{20,w} = 11,35$. Возьмем значение стоксова радиуса для этого белка ($a = 52$ Å) и подсчитаем его массу:

$$M = \frac{52 \cdot 10^{-8} \cdot 6,3 \cdot 14 \cdot 0,01 \cdot 6,02 \cdot 10^{23} \cdot 11,35 \cdot 10^{-13}}{1 - 1/1,38} \approx 244\,000.$$

Мы получили результат, достаточно хорошо совпадающий с приведенным выше значением M для каталазы.

Намеченный здесь путь определения массы нативного белка не прост, особенно в том случае, когда константа седиментации белка неизвестна. Кроме того, даже и он не гарантирует высокой точности результатов. Как показывают более тщательные исследования [Le Maire et al., 1980], отмеченный выше факт определенной ориентации асимметричных белков по порам геля следует учитывать и при обычных скоростях гель-фильтрации, а линейная аппроксимация калибровочных графиков даже для стоксовых радиусов может быть принята только в качестве первого приближения. Наконец, маркерные белки часто гетерогенны по величине a , и пользоваться литературными данными здесь следует с большой осторожностью.

Отсюда следует вывод, что определение молекулярной массы нативных белков с помощью гель-фильтрации, даже проведенное на уровне описанного выше современного подхода к этой задаче, может дать лишь приближенный результат. Тем более это справедливо в случае весьма распространенного упрощенного способа использования калибровочных кривых, построенных по молекулярным массам маркерных белков без учета их формы. То же относится к определению гель-фильтрацией молекулярных масс нативных нуклеиновых кислот с помощью маркерных НК известной массы, когда в число таких маркеров тРНК включают наряду с рибосомальными РНК, а нередко и фрагментами ДНК. Говорить же серьезно об определении молекулярных масс НК с помощью калибровочных графиков, построенных для белков, что иногда еще можно встретить в литературе, не приходится.

И тем не менее, в тех случаях, когда нужно хотя бы приближенно оценить молекулярную массу нативного белка, например состоящего из нескольких субъединиц или полипептидных цепей, метод гель-фильтрации, даже в упрощенном варианте калибровки по массам, оказывается весьма полезным. Он позволяет выяснить, какое

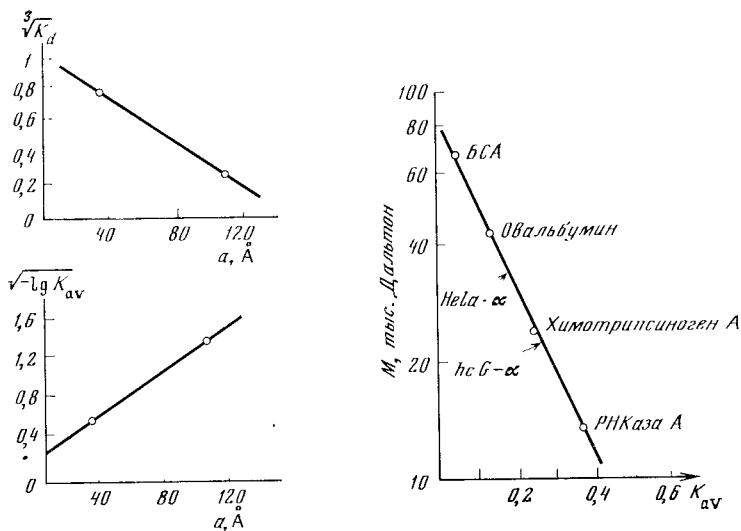


Рис. 76. Линейные зависимости между параметрами гель-фильтрации белков и величинами их стоксовых радиусов (a) [Porath, 1963; Laurent, Killander, 1964]

Рис. 77. Калибровочный график для колонки сефадекса G-75 «Superfine» и определение по нему молекулярных масс α -белка из клеток HeLa и гонадотропина человека (hc G- α) [Cox, 1981]

число таких цепей или субъединиц образует нативную молекулу, с тем чтобы истинные значения молекулярных масс полипептидных цепей можно было затем определить гель-фильтрацией в денатурированном состоянии и подсчитать полную массу молекулы сложного белка как сумму этих значений.

Ввиду этого, прежде чем перейти к описанию определения методом гель-фильтрации молекулярных масс денатурированных белков, имеет смысл в качестве иллюстрации кратко процитировать хотя бы три практически полезных примера определения молекулярной массы нативных белков и пептидов.

Типичный пример такого определения с построением калибровочной кривой по молекулярным массам маркерных белков можно найти в недавней работе Кокса [Cox, 1981]. Автор сопоставлял молекулярные массы α -белка из клеток HeLa и гонадотропина из мочи человека (надо отдать ему должное: определяемые значения молекулярных масс он называет «кажущимися» — «apparent»). Определение производилось на колонке с сефадексом G-75 «Superfine» размером $2,5 \times 135$ см ($V_t = 675$ мл). Объем препарата — 3 мл ($< 0,5\%$ V_t). Элюирую вели 0,1 M раствором NH_4HCO_3 при 4° со скоростью 12 мл/ч (2,4 мл $\text{см}^2 \cdot \text{ч}$). Для построения калибровочного графика использовали РНКазу ($M = 13\,700$), химотрипсиноген А ($M = 25\,000$), овальбумин ($M = 43\,000$) и БСА ($M = 68\,000$). Как видно из рис. 77, график практически прямолинеен, а точки, соответствующие исследуемым белкам, лежат вдали от его концов.

Мейер и соавторы поступали еще проще. Для того же сефадекса G-75 «Superfine» они дают эмпирическое уравнение для калибровочной прямой: $\log M = 5,624 - 0,752 V_R/V_0$. Была использована колонка размером 3×200 см, но для достаточно длинной колонки отношение V_R/V_0 от ее размеров зависеть не должно [Meyer et al., 1979].

Вильгус и Стеллваген определяли молекулярные массы пептидов в диапазоне 500—20 000 гель-фильтрацией на колонке сефадекса G-50 «Superfine» (5×150 см) со скоростью 2 мл·см⁻²·ч. Пептиды растворяли в 10%-ной HCOOH. В кислоте хорошо растворяются даже гидрофобные пептиды; кроме того, за счет положительных зарядов цепочки пептидов расправляются, что обеспечивает большую степень однородности их формы. Для построения калибровочного графика авторы использовали шесть известных по составу пептидов неполного бромцианового гидролизата цитохрома с из сердца лошади. Они нашли, что калибровочный график может быть хорошо представлен прямой линией, построенной по уравнению: $\log M = 4,79 - 0,42 V_R/V_0$ [Wilgus, Stellwagen, 1979].

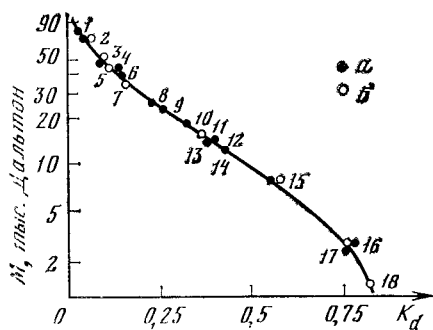
ДЕНАТУРИРОВАННЫЕ БЕЛКИ

Недостоверность определения молекулярной массы нативных белков заставила искать такой способ использования гель-фильтрации, при котором эта неопределенность была бы сведена к минимуму. Решение было найдено за счет отказа от сохранения нативности белка и перехода к его полной денатурации, с диссоциацией субъединиц и разрывом всех внутримолекулярных связей, в том числе и дисульфидных мостиков. Образующиеся при такой глубокой денатурации полипептидные цепи белка сворачиваются в рыхлые статистические клубки, размер которых (стоков радиус) зависит только от длины цепи. Это нивелирует различия формы и плотности упаковки нативных белков, оставляя действенным только один параметр — длину полипептидной цепи, т. е. молекулярную массу. Различиями аминокислотного состава, разумеется, приходится пренебречь, полагая, что для достаточно крупных (и не уникальных по составу) белков аминокислотный состав в среднем одинаков.

В качестве такой сильно денатурирующей обработки было предложено растворять белок в 6 М водном растворе гуанидинхлорида с добавлением в него до 0,1 М β-меркаптоэтанола (или ДТТ) при щелочном значении pH (8,6) [Fish et al., 1969]. Перед началом хроматографии белок выдерживают в этом растворе в течение 4—8 ч. Кстати, 6 М гуанидинхлорид является превосходным растворителем для белков. Восстановленные SH-группы во избежание образования новых дисульфидных мостиков в ходе самой элюции (β-меркаптоэтанол предпочитают в элюент не вводить) алкилируют обработкой иодацетатом или иодацетамидом. Элюцию ведут 6 М раствором гуанидинхлорида в воде или буфере. В цитируемой работе таким образом денатурировали 18 белков и пептидов с молекулярными массами

Рис. 78. Калибровочный график для колонки с биогелем А-5m (см. текст) [Fish et al., 1969]

а — белки, алкилированные обработкой иодацетатом; б — белки не были алкилированы, но в элюент добавлен β-меркаптоэтанол; 1 — трансферрин; 2 — БСА; 3 — такаамилаза; 4 — овальбумин; 5 — тяжелая цепь γG; 6 — альдолаза; 7 — малатдегидрогеназа; 8 — химотрипсिनоген; 9 — легкая цепь γG; 10 — β-лактоглобулин; 11 — гемоглобин; 12 — лизоцим; 13 — РНКаза; 14 — цитохром с; 15 — BrCN-пептид I цитохрома с; 16 — инсулин; 17 — BrCN-пептид II цитохрома с; 18 — BrCN-пептид III цитохрома с



от 2900 до 76 000. С их помощью строили градуировочную кривую (график селективности) для колонки биогеля А-5m ($1,5 \times 85$ см) при скорости элюции 3 мл/см²·ч. Объем препарата — 0,15 мл (0,1% V_i). В одно разделение пускали 4-5 белков, по 10 мг каждого. Для определения V_0 и V_i к белкам добавляли голубой декстран до 0,6% и ДНФ-аланин до 0,1% (или ¹⁴С-глицин). На рис. 78 показана полученная авторами зависимость. В диапазоне 7000—40 000 Дальтон она оказалась практически линейной.

Та же группа авторов позднее нашла связь между стоковым радиусом и молекулярной массой для денатурированных таким образом белков. Она может быть представлена формулой $a = KM^{0,555}$, где K — константа [Fish et al., 1970].

Большинство гелей, в частности агарозных, плохо выдерживает воздействие 6 М раствора гуанидинхлорида. Скорость течения падает, гранулы начинают лопаться, и колонка скоро выходит из строя. К этому надо добавить, что 6 М раствор гуанидинхлорида обладает заметной вязкостью, что заставляет повышать давление, подаваемое на колонку.

Никаких «неприятностей» не происходит, если воспользоваться «спитой» агарозой. По данным Ансари и Мэйг, колонка с сефарозой CL-6В выдерживала воздействие 6 М гуанидинхлорида без видимых изменений своих характеристик в течение 10 мес. Жесткость матрицы позволила им увеличить скорость элюции до 6,8 мл/см²·ч. Авторы использовали колонку размером $1,5^* \times 90$ см, а элюцию вели 6 М раствором гуанидинхлорида в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рН 7. Для семи белков с молекулярными массами от 2900 до 69 000 был получен совершенно линейный калибровочный график [Ansari, Mage, 1977].

Белев и соавторы для определения молекулярных масс денатурированных белков методом гель-фильтрации использовали сефакрил S-200 «Superfine». Колонку размером $1,6 \times 100$ см калибровали четырьмя полипептидами с известным числом аминокислотных остатков (N) — от 71 (токсин) до 579 (БСА). Элюцию вели 6 М водным раствором гуанидинхлорида (рН 5) со скоростью 3 мл/см²·ч. Для точности объем элюента определяли по весу. График селектив-

ности (калибровочную прямую) эти авторы предпочли строить в координатах $\log(100 K_d)$ и $N^{1/3}$. По их данным, сефакрил этой марки очень удобен для определения молекулярных масс биополимеров в диапазоне 1—30 тыс. Дальтон [Belew et al., 1978].

Следует заметить, что далеко не всегда математические функции, описывающие какую-либо графическую зависимость, выражают некую физическую взаимосвязь величин. Нередко эти функции подбирают для того, чтобы линеаризовать полученную в эксперименте нелинейную зависимость. Смысл этого только в том, что с помощью прямолинейного графика удобнее определять параметры исследуемого объекта.

Техника подготовки колонки и препаратов для гель-фильтрации в 6 М растворе гуанидинхлорида описана довольно подробно [Mann, Fish, 1972]. 6 М раствор гуанидинхлорида (~50%) должен быть прозрачным. Оптическая плотность его резко увеличивается только вблизи длины волны 225 нм. Перед использованием раствор следует отфильтровать сперва через средний, а затем — через мелкий стеклянный фильтр и деаэрировать.

В заключение упомянем, что довольно внушительный список калибровочных белков и пептидов со значениями молекулярных масс и K_{av} для гель-фильтрации на сефарозе 6В в 6 М растворе гуанидинхлорида приведен в работе Брайса и Кричтона [Bryce, Crichton, 1971], а также цитируется в уже упомянутой монографии [Mikes, 1979].

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ (ЖХВД)

Гель-фильтрация (эксклюзивная хроматография) биополимеров при высоком давлении делает еще свои первые шаги, поэтому естественно, что методические подходы здесь претерпевают быстрое изменение и появляющиеся в периодической печати рекомендации достаточно противоречивы. Мы постараемся отметить эти противоречия, понимая, что право их окончательного разрешения принадлежит только практике эксперимента.

В качестве матриц для гель-фильтрации при высоком давлении используют крупнопористые силикагели, покрытые «гликофазой» (т. е. обработанные глицерилпропилсиланом) для подавления сорбции на поверхности силикагеля. Впрочем, не исключено, что используются и другие способы обработки, поскольку рецепты приготовления появляющихся на рынке новых матриц фирмы не публикуют. Эти матрицы выпускают в виде сферических гранул диаметром 5 и 10 мкм. Как и для других хроматографических методов, с переходом к использованию гранул таких размеров можно ожидать значительного повышения разрешающей способности гель-фильтрации в режиме фракционирования макромолекул (см. гл. 1). Соответственно должны увеличиться рабочие давления и скорости элюции. Что касается последнего обстоятельства, то здесь, по-

видимому, следует проявлять разумную сдержанность, имея в виду малую скорость диффузии биополимеров, так что вряд ли возможно рассчитывать на сохранение скоростных режимов фракционирования, ставших уже привычными для использования ЖХВД в органической химии малых молекул. Однако эта точка зрения отнюдь не является общепринятой вследствие, как нам кажется, еще действующей здесь инерции представлений.

Например, в 1979 г. было описано фракционирование нативных белков с молекулярными массами 12—68 тыс. Дальтон на колонках «Lichrosorb-DIOL» (5 мкм) размерами $0,6 \times 25$ и $2,3 \times 25$ см. Авторы сообщили об успешном разделении классического набора стандартных белков (БСА, овальбумин, химотрипсиноген, лизоцим, цитохром с), о линейной зависимости $\log M$ от V_R и подчеркнули, что все фракционирование у них занимало 6 мин. При этом скорость элюции составляла $270 \text{ мл см}^{-2} \cdot \text{ч}$ [Roumeliotis, Unger, 1979]. Если мы сравним эту цифру с той, что была приведена выше при описании построения калибровочного графика (см. рис. 72) для сефадекса G-75 «Superfine» с использованием тех же белков, то увидим, что скорости элюции различаются более чем в 100 раз. Возникает вопрос — правомерно ли такое увеличение скорости, если иметь в виду, что средний диаметр гранул уменьшен только в 5—6 раз? Успевают ли установиться равновесие поперечной диффузии между фазами? Имеется ли выигрыш в эффективности разделения фракций, который можно ожидать от ЖХВД, или авторы пожертвовали им ради скорости процесса? Кстати говоря, такая жертва может быть целесообразной при работе с очень лабильными белками, но в большинстве случаев биохимик-исследователь, вероятно, предпочел бы увеличить длительность опыта до часа или даже нескольких часов, если бы это сулило ему существенный выигрыш в разрешении белковых фракций. Только ради экономии времени вряд ли имеет смысл в биохимической лаборатории идти на внушительные затраты средств, связанные с приобретением колонок и аппаратуры для ЖХВД.

В том же номере журнала описано разделение нативных белков с молекулярными массами в интервале 13—340 тыс. Дальтон на колонке «Varian MicroPak TSK GEL 3000 SW» размером $0,75 \times 30$ см. При среднем диаметре гранул 10 мкм скорость элюции здесь также составляла около $140 \text{ мл см}^{-2} \cdot \text{ч}$, так что все поставленные выше вопросы относятся и к этой работе. Авторы резонно замечают, что эксклюзия нативных белков зависит от их формы (у них альбумин с $M = 69\,000$ намного опережал гемоглобин с $M = 68\,000$) и что следует переходить на гель-фильтрацию денатурированных белков [Wehr, Abbott, 1979].

В том же году Уи провел фракционирование набора из 16 денатурированных белков на колонке «TSK-GEL 3000 SW» (фирмы «Toyo Soda») размером $0,75 \times 60$ см. В качестве элюента был использован, как обычно, 6 М раствор гуанидинхлорида в 0,01 М фосфатном буфере, pH 6,5. Скорость элюции была снижена до $66 \text{ мл см}^{-2} \cdot \text{ч}$, и фракционирование длилось 50 мин. Как видно из рис. 79, точки калибровочного графика хорошо ложатся на прямую

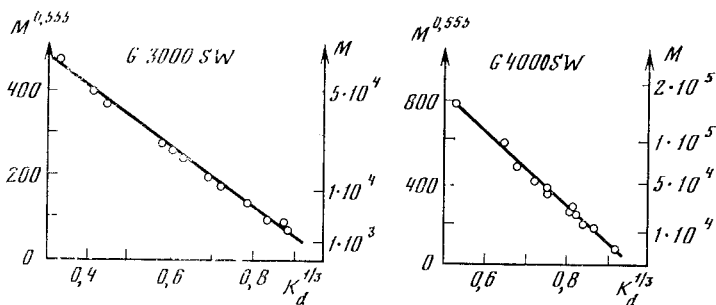


Рис. 79. Калибровочные графики для колонок «TSK-GEL 3000 SW» и «4000 SW» в координатах $M^{0,555}$ и $K_d^{1/3}$ [Ui, 1979]

линию, если по осям координат откладывать величины $M^{0,555}$ и $K_d^{1/3}$ (выше отмечалось, что стоксов радиус для денатурированных белков пропорционален $M^{0,555}$). Об эффективности разрешения белковых фракций по сравнению с гель-фильтрацией при низком давлении в работе сведений не приводится [Ui, 1979].

Впрочем, в другой работе, где на такой же колонке и при такой же скорости элюции фракционировали в нативном виде ряд гормонов (ЖГ, ФСГ, гонадотропин, гормон роста) и аллергенов с молекулярными массами в интервале 20—46 тыс. Дальтон (а также их субъединицы), было получено неплохое разрешение пиков, так что по сравнению с гель-фильтрацией на сефадексе G-100 было ясно выражено преимущество ЖХВД не только в скорости, но и в разрешающей способности метода [Calam, Davidson, 1981].

На трех соединенных последовательно колонках того же типа недавно удалось разделить сходные по молекулярной массе и заряду легкие цепи миозина после обработки его 4 М раствором мочевины. Элюцию вели 0,2 М К-фосфатным буфером в присутствии 2 М мочевины со скоростью 67 мл/см²·ч; разделение занимало 2,5 ч. Для такого же разделения гель-фильтрацией на агарозе требуется около 9 сут [Watabe et al., 1983].

В тщательно выполненной работе Монтеларо и соавторов гель-фильтрацию денатурированных и нативных белков проводили на колонке «MicroPak TSK-GEL 3000 SW» (0,8 × 30 см), снизив скорость элюции до 24—48 мл/см²·ч, что, кстати говоря, обеспечивалось весьма умеренным перепадом давлений (7—14 атм). Способы денатурации белков были выбраны более жесткими, чем обычно: обработка 8 М раствором гуанидинхлорида в присутствии 1% β-меркаптоэтанола при 100° в течение 2 мин или 1%-ным раствором ДДС-На в тех же условиях. Калибровочная прямая, построенная по девяти точкам в обычной системе координат ($\log M$, K_d), выглядит так же, как при обычной гель-фильтрации. Об эффективности фракционирования прямых данных нет (K_d определяли для каждого белка отдельно), но упоминается, что для надежного разделения двух пиков отношение молекулярных масс соответствующих белков должно быть

примерно 2 : 1, т. е. не лучше, чем при обычной гель-фильтрации на сефадексе. Представляет несомненный интерес следующее наблюдение авторов: при денатурации белков гуанидинхлоридом пики фосфорилазы ($M = 93\ 000$) и БСА ($M = 68\ 000$) не разделялись, тогда как денатурация с помощью ДДС-Na (и элюция 0,1 %-ным ДДС-Na) позволила эти пики разделить [Montelaro et al., 1981]. Это наблюдение наводит на мысль о возможном участии в процессе механизмов взаимодействия белков с материалом матрицы (гидрофобной или иной природы).

В пользу такого предположения говорят результаты следующей работы [Kato et al., 1980], в которой на колонках того же типа разделяли белки, также денатурированные обработкой ДДС-Na (2% ДДС-Na и 20 мМ ДТТ в течение ночи при 25°). Авторы обнаружили, что объем элюции для каждого белка увеличивается с ростом концентрации элюирующего фосфатного буфера (от 0,02 до 0,2 М) и тем сильнее, чем меньше молекулярная масса белка. Одновременно пики расширяются, а при концентрации буфера 0,5 М не разрешаются вовсе. Разделение вели на двух соединенных последовательно колонках размером $0,75 \times 60$ см со скоростью элюции 140 мл/см²·ч. Разрешение пиков даже при низкой концентрации буфера, судя по приведенному профилю элюции, было невысоким.

Заметим, кстати, что аналогичный эффект концентрации фосфатного буфера наблюдался и при обычной гель-фильтрации, а именно при обессоливании нуклеотидов, НАД и других гетероциклических и ароматических соединений на биогеле Р-2 [Engel, 1977]. Автор указывал, что этот эффект обусловлен гидрофобным взаимодействием фракционируемых молекул с материалом матрицы, которое усиливается в присутствии фосфата.

Возможность весьма существенного вклада ионных взаимодействий в задержание белков при гель-фильтрации на силикагелевых матрицах недавно убедительно продемонстрировали Румелиотис и Унгер, работая с колонкой «Li Chrosorb-DiOL». Они вели элюцию слабым фосфатным буфером, содержащим 0,02 М NaCl, и варьировали его рН. Обследуя поведение ряда нативных белков, авторы нашли, что для некоторых из них объем элюции сильно зависит от рН. Так, в случае колонки размером $0,6 \times 25$ см, свободный объем которой $V_0 = 3,2$ мл, а полный объем жидкой фазы $V_0 + V_i = 5,7$ мл, при изменении рН от 5,42 до 6,56 объем элюции (V_R) альдолазы уменьшался с 5,8 до 4,92 мл, а при рН 9,49 падал до 3,29 мл. Для других белков исследованной серии (каталазы, альбумина, химотрипсिनогена, миоглобина и цитохрома *c*) изменения V_R были того же порядка: в пределах 13—20% при вариациях рН в слабнокислой и нейтральной областях с весьма существенным падением V_R при защелачивании буфера. В качестве ионогенных групп матрицы, по мнению авторов, выступают депротонированные силанольные группы $\equiv\text{SiO}$ ($pK_a = 6,8$). Ионные взаимодействия можно ослабить, как обычно, введением соли в элюент. В этом же исследовании отмечается и не столь сильное, но ощутимое (для определения M) влияние гидрофобных взаимодействий белков с матрицей. Для

всех перечисленных белков (кроме химотрипсिनогена) наблюдалось уменьшение V_R при введении в элюент до 5% метанола. Предполагается, что со стороны матрицы в гидрофобном взаимодействии участвует углеводородная цепочка гликофазы [Roumeliotis, Unger, 1981].

Исследование роли ионных взаимодействий белков с матрицей в зависимости от pH и ионной силы и возможности использования этих взаимодействий для улучшения разделения белков проведено в работе [Karasić, Regnier, 1982]. Авторы наблюдали еще более сильно выраженные эффекты. Так, при ионной силе 0,01 и изменении pH элюента от 5,2 до 8,2 значение K_d для миоглобина изменялось от 1,4 до 0,4. Увеличение ионной силы до 0,1 снижало это различие до 0,9 и 0,7. Подбором оптимального значения pH элюента при низкой ионной силе можно добиться хорошего разделения близких по молекулярной массе белков. Для колонки «TSK G 3000 SW» при pH 6,3 снижение ионной силы до 0,01 приводило к увеличению K_d для миоглобина до единицы, в то время как для овальбумина этот параметр уменьшался до 0,2.

В свете этих наблюдений, возможно, следует трактовать неожиданные результаты недавно опубликованной работы [Barden, 1983]. На двух соединенных последовательно колонках типа «Protein column» I-125 и I-250 фирмы «Waters» и на колонке, заполненной смесью тех же матриц, была получена линейная обратная зависимость времени задержания на колонке от $\log M$ для набора нативных белков с молекулярной массой от $2 \cdot 10^3$ до $2 \cdot 10^6$, причем в состав этого набора входили как глобулярные, так и фибриллярные белки (в их числе — легкая цепь меромиозина с соотношением осей 50 : 1 и тропомиозин с соотношением 25 : 1). Элюцию вели 0,02 М раствором CH_3COONa (pH 6,5) с 0,5 мМ ДТТ. Сравнение с приведенными выше данными позволяет предположить, что ионные взаимодействия в данном случае подавлены не были. Для кислых белков при pH 6,5 они должны иметь характер слабого выталкивания — компактная упаковка глобулярных белков может обусловить более заметный вклад этого фактора в процесс элюции, чем это имеет место в случае фибриллярных белков. Кстати, и сам автор отмечает, что при увеличении концентрации соли порядок элюции определяется уже не молекулярными массами, а стоковыми радиусами белковых молекул.

Недавно Хефти сообщил о весьма заметной сорбции белков на материале матрицы колонки I-125. Эту сорбцию удается подавить, если элюцию вести буфером, содержащим 20% этанола и 0,32 М NaCl [Hefti, 1982]. В другой работе [Von Stetten, Schlett, 1981] было показано, что взаимодействие белков с матрицей колонок этого типа носит в основном гидрофобный характер. Авторы подавляли его введением в элюент *n*-пропанола (0,36 М формиат пиридина, pH 5, и *n*-пропанол в соотношении 3 : 1).

В свете этих замечаний следует оценивать предложения, высказанные в работе Лазюра и др. [Lazure et al., 1982]. Авторы вели гель-фильтрацию под высоким давлением на четырех последователь-

но соединенных колонках только что упомянутого типа, но с различной пористостью: за колонкой «Protein Column I-60» следовали две колонки I-125, а замыкала этот «тандем» колонка типа I-250 (диапазоны фракционирования — соответственно 1—20, 2—50 и 10—500 тыс. Дальтон). Здесь нас интересует не вариант последовательного включения колонок разной пористости (у нас нет достаточных данных для его оценки), а то обстоятельство, что для элюции авторы использовали (из-за его летучести) довольно гидрофобный триэтиламиноформатный буфер в концентрации 0,2 М. Элюцию вели на большой скорости (135 мл/см²·ч); данных по разрешающей способности системы не приводится. Калибровочный график снимали для 14 белков с молекулярными массами в интервале 500—150 000. Его удалось представить в линейной форме путем построения довольно сложной зависимости выражения $(\sqrt[3]{V_R} - \sqrt[3]{V_0}) / (\sqrt[3]{V_t} - \sqrt[3]{V_0})$ от величины $\sqrt[3]{M}$. Для денатурированных белков точки на прямую линию ложатся заметно лучше, чем для нативных. С этой же целью (для подавления гидрофобных взаимодействий) Свергольд и Рубин проводили элюцию с двух соединенных тандемом колонок типа «TSK G 3000 PW» (на полиэфирной основе) 36%- или 45%-ным раствором ацетонитрила в 0,1%-ной трифторуксусной кислоте. Это дало возможность успешно разделить 12 пептидов с молекулярными массами от 307 до 134 000 [Swergold, Rubin, 1983].

В последние три года (1981—83 гг.) опубликовано довольно много работ по гель-фильтрации белков методом ЖХВД, и число примеров можно было бы умножить. Однако это вряд ли целесообразно, так как в большинстве случаев авторы ставят перед собой одну и ту же (на наш взгляд, не самую важную для биохимика) задачу — провести процесс гель-фильтрации белков или НК с максимальной скоростью, не очень заботясь о повышении его эффективности. С иных позиций выступила в начале 1982 г. фирма «LKB», специалисты которой имеют давний и общепризнанный опыт в области методов фракционирования биологических макромолекул.

Выше говорилось о том, что фирма «LKB» выпускает матрицы типа «Ultropac TSK». По-видимому, их материал сходен с тем, который был разработан японской фирмой «Toyo Soda» и выпускается фирмами «Beckman» и «Varian». Вместе с тем в своих рекламных материалах фирма демонстрирует результаты опытов по фракционированию белков, резко отличающиеся от того, что стало привычным для гель-фильтрации на обычных матрицах.

В качестве примера на рис. 80 воспроизведен взятый из фирменной брошюры «High Performance Liquid Chromatography for Biochemist» профиль элюции, полученный при гель-фильтрации смеси из восьми белков на колонке «Ultropac TSK G 3000 SW» (0,75 × 60 см) фирмы «LKB». Смесь содержала по 5—10 мкг каждого белка в общем объеме 75 мкл. Элюцию вели 0,1 М фосфатным буфером, рН 6,8, содержавшим 0,1 М NaCl. Пики регистрировали по УФ-поглощению на длине волны 206 нм. Качество разделения произво-

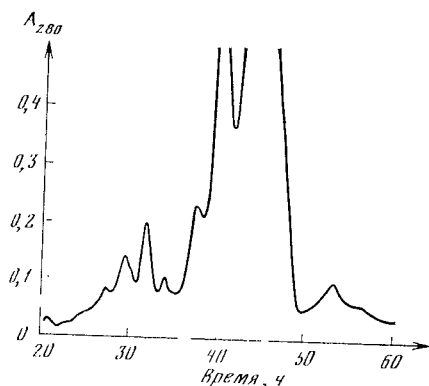
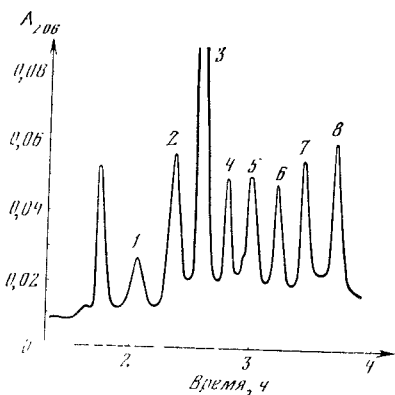


Рис. 80. Разделение смеси белков на колонке «Ultracac TSK G 3000 SW»

- 1 — апоферритин ($M = 48 \times 10^4$);
- 2 — γ -глобулин ($M = 16 \times 10^4$);
- 3 — сывороточный альбумин человека ($M = 68 \times 10^3$);
- 4 — овалбумин ($M = 45 \times 10^3$);
- 5 — карбангидраза ($M = 31 \times 10^3$);
- 6 — миоглобин ($M = 17 \times 10^3$);
- 7 — аprotинин ($M = 6 \times 10^3$);
- 8 — тирозин ($M = 180$)

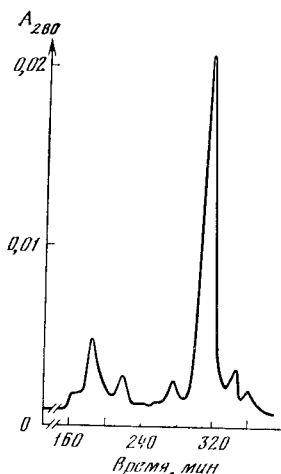


Рис. 81. Препаративная гель-фильтрация белков сыворотки человека на колонке «Ultracac TSK G 4000 SW»

Рис. 82. Заключительный этап очистки фермента (протеиназы) гель-фильтрацией на колонке «Ultracac TSK G 3000 SW» [Nelson, Traub, 1982]

дит очень выгодное впечатление, особенно если учесть, что соотношение молекулярных масс у соседних пиков 3 и 4, 4 и 5 равно 1,5 : 1. «Секрет» этого успеха очень прост: фракционирование проводили со скоростью 13,5 мл/см²·ч в течение 4 ч.

Профиль препаративного фракционирования белков сыворотки человека, воспроизводимый по тому же источнику, показан на рис. 81. Здесь 1,5 мл неразбавленной сыворотки вносили на препаративную колонку «LKB Ultracac TSK G 4000 SW» размером 2,15 × 60 см. Элюцию вели 0,1 М Na-фосфатным буфером (pH 6,3), содержащим 0,1 М KCl и 0,05% NaN₃. Скорость элюции была в этом случае еще ниже — 70 мкл/мин, что составляет 1,2 мл/см²·ч. Фракционирование длилось около 60 ч (чем и обусловлено введение азид натрия), но зато удалось решить задачу, совершенно недоступную для обычной гель-фильтрации, — выделить ряд четких пиков при фракционировании белков сыворотки по размерам.

В другой брошюре этой же фирмы, выпущенной в середине 1982 г. («Application and Technical Notes. Liquid Chromatography»),

приведено довольно много примеров аналогичного фракционирования и очистки от примесей не только белков, но и пептидов, гликопротеидов, нуклеиновых кислот и даже рестриктазных фрагментов ДНК. Нет смысла их здесь воспроизводить. Достаточно отметить, что все эти примеры иллюстрируют плодотворность того же самого подхода: использования мелкозернистой матрицы для получения высокого разрешения пиков при сохранении обычных для гель-фильтрации при низком давлении скоростей элюции (в большинстве случаев — $13,5 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$ или ниже).

Следует еще раз подчеркнуть, что при этом можно ограничиться весьма умеренными перепадами давления на колонке, допустить заметный уровень его пульсации и вообще отказаться от использования дорогостоящих современных хроматографов для ЖХВД в пользу более простых систем, подобных той, которая была разработана для хроматографии белков фирмой «Pharmacia» и подробно описана в конце гл. 3. Разумеется, при обессоливании или смене буфера, в котором растворен белок, нет нужды вести элюцию столь же медленно, и в соответствующем примере из той же брошюры фирмы «LKB» использована скорость более $90 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$. Еще большие скорости элюции могут потребоваться при использовании гель-фильтрации под высоким давлением для целей технологического экспресс-контроля, например в пищевой промышленности, но в этом случае от требования высокой разрешающей способности метода придется отказаться и нельзя будет обойтись без использования специальной аппаратуры для ЖХВД.

В заключение отметим, что целесообразность проведения гель-фильтрации с использованием силикагелевых матриц при малых скоростях элюции получает уже признание и у исследователей. Так, в одной из недавних работ [Nelson, Traub, 1982] на заключительном этапе очистки фермента была использована гель-фильтрация на колонке «Ultropac TSK G 3000 SW» ($0,75 \times 60 \text{ см}$), которую вели со скоростью 46 мл/мин , т. е. $6,3 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$. При этом насос высокого давления («Waters» 6000 A) использовали для создания перепада давлений всего лишь в 5 атм. Зато разделение пиков было необычайно хорошим (рис. 82).

Такую же малую скорость элюции с колонки «Ultropac TSK G 4000 SW» ($0,75 \times 60 \text{ см}$) использовали Греве и соавторы для фракционирования РНК, в частности моноцистронных вирус-специфических мРНК. Для этой цели они смогли ограничиться давлением, которое создавал перистальтический насос «Micro Perplex» фирмы «LKB» [Graeve et al., 1982].

Позже те же авторы описали фракционирование гель-фильтрацией на двух соединенных последовательно колонках типа «Ultropac TSK G 3000 SW» и «...G 2000 SW» малых ядерных РНК из клеток HeLa. Скорость элюции составляла $13,5 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$. Аналогично осуществляли хроматографическую очистку виридных РНК из зараженных листьев томата [Graeve et al., 1983].

Все сказанное выше относилось в первую очередь к гель-фильтрации белков и нуклеиновых кислот, т. е. высокомолекулярных

соединений. Иная ситуация складывается в случае пептидов. Ввиду относительно быстрой их диффузии в гранулы матрицы можно использовать характерные для ЖХВД высокие скорости элюции. Так, недавно были описаны успешные опыты по определению молекулярных масс пептидов на колонках с силикагелевой основой («Bio-Gel TSK 20» и «Bio-Gel TSK 125») размером $0,75 \times 30$ см. В первой из них силикагель был модифицирован гидроксильрованными полиэфирами, во второй — силаноильными группами. Элюцию вели 6 М раствором гуанидинхлорида со скоростью 1 мл/мин. Для колонки первого типа наблюдалась линейная зависимость $\log M$ от объема элюции в интервале молекулярных масс 1—12 тыс., а для колонки второго типа — в интервале 1—18 тыс. Хроматографический процесс занимал соответственно 7 и 17 мин. Во втором случае объем элюции вдвое превысил полный объем жидкой фазы в колонке, что указывает на наличие сорбции пептидов на матрице [Richter et al., 1983].

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ

Вместо цилиндрической колонки матрицу пористого геля можно нанести толстым слоем на стеклянную пластинку и вести элюцию током жидкости, текущей вдоль пластинки с одинаковой скоростью по всей ее ширине. Такое течение можно осуществить в наклоненной под небольшим углом пластинке, на концы которой равномерно наложены фитили из фильтровальной бумаги, погруженные с другой стороны в резервуары с элюентом (рис. 83). В качестве гелей используют, например, сефадексы типа «Superfine». Препараты наносят на стартовую линию в верхней части пластинки. Как и в колонке, высокомолекулярные компоненты смеси молекул будут двигаться между гранулами, вместе с током подвижной фазы, а компоненты меньшего размера (и молекулярной массы) будут продвигаться к нижнему краю пластинки тем медленнее, чем большая часть внутреннего объема гранул (V_i) окажется для них доступной.

Метод гель-фильтрации в тонком слое (ТСГФ) имеет ряд преимуществ перед колоночной хроматографией. Во-первых, на стартовую линию пластинки шириной, например, 20 см можно нанести 10—15 препаратов в виде пятен диаметром 3—5 мм, что позволяет сопоставлять результаты фракционирования многих препаратов в одном опыте, в идентичных условиях. Во-вторых, благодаря малой толщине слоя геля (0,4—1 мм) объем препарата может быть уменьшен до 5—20 мкл. Соответственно можно сильно уменьшить и количество фракционируемого материала, тем более что для его детектирования в этом случае можно использовать высокочувствительные методы окраски (см. ниже). Нет проблем и с обеспечением ровного слоя препарата — он мигрирует в виде пятна, как обычно при ТСХ. Наконец, нет необходимости ожидать, пока все компоненты фракционируемой смеси один за другим достигнут конца пластинки. Процесс разделения прекращают, как только наиболее «быстрый» компонент приблизится к нижнему краю геля. В этот момент регистрируют

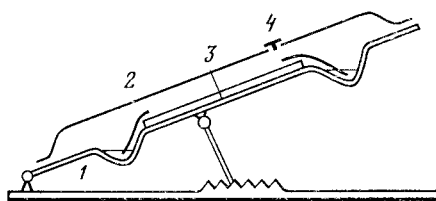
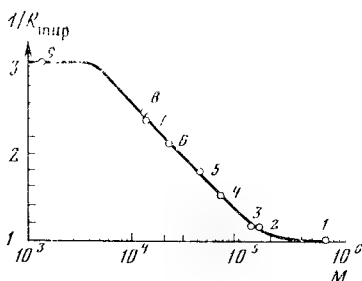


Рис. 83. Схема прибора для гель-фильтрации в тонком слое («Pharmacia TLC Apparatus»)

1 — столик; 2 — прозрачная крышка; 3 — пластинка; 4 — резиновая вставка

Рис. 84. Калибровочный график для гель-фильтрации в тонком слое сефадекса G-150 «Superfine» (по данным фирмы «Pharmacia»)

1 — тиреоглобулин; 2 — γ -глобулин; 3 — БСА, димер; 4 — БСА; 5 — овалбумин; 6 — ингибитор трипсина; 7 — РНКазы А; 8 — цитохром с; 9 — витамин B_{12}



картину расположения всех остальных компонентов на пути их миграции. Это существенно экономит время фракционирования (правда, разрешение медленно мигрирующих компонентов при этом может пострадать, если для них длина хроматографического пути окажется слишком малой).

Однако есть и свои трудности. Они связаны с формированием слоя геля. Не ограниченный стенками колонки слой геля на всей открытой поверхности пластинки должен быть одинаковым и однородным. Его консистенция должна быть оптимальной, чтобы гранулы плотно прилегали друг к другу и весь объем между ними был заполнен жидкостью, но чтобы не было и ее избытка над поверхностью слоя геля. Нельзя допустить подсыхания геля во время хроматографического процесса — для этого его следует держать в атмосфере насыщенного пара.

Скорость течения жидкости (скорость элюции) можно регулировать наклоном пластины (обычно в диапазоне $5-20^\circ$). Для проявления результатов фракционирования удобнее всего воспользоваться методом снятия реплики. На влажный гель на 1 мин кладут листок толстой фильтровальной бумаги («Whatman 3 MM») и прижимают его стеклянной пластиной. За это время жидкость из пространства между гранулами переходит на бумагу, а вместе с ней — и макромолекулы, находившиеся в подвижной фазе каждой хроматографической зоны. Фильтровальную бумагу затем подсушивают и пятна на ней выявляют одним из многочисленных методов окраски белков или НК, путем регистрации ферментативной активности, радиоактивности, иммунными методами и т. д. Все эти методы выявления были подробно рассмотрены при описании электрофореза и иммуноэлектрофореза [Остерман, 1984, 1983].

Фирма «Pharmacia» предлагает простой прибор для ТСГФ, устройство которого показано в разрезе на рис. 83. В прибор можно

установить либо две пластинки размером 20×20 см, либо одну — 20×40 см. Столик (1) для установки пластинок вместе с выштампованными в нем резервуарами для элюента можно устанавливать под выбранным углом наклона в пределах от 10 до 45° . Столик закрывает герметизированная прокладками прозрачная крышка (2), так что объем камеры оказывается минимальным и он быстро заполняется парами элюирующей жидкости, находящейся в резервуарах. Препараты после предварительного уравнивания пластинок (3) током элюента можно вносить на поверхность геля не снимая крышки — через прорезы в ней. Во время элюции эти прорезы закрыты резиновыми вставками (4).

Фирма рекомендует использовать для ТСГФ сефадексы типа «Superfine» в следующих количествах на 100 мл суспензии (в граммах): G-50— $10,5$; G-75— $7,5$; G-100— $6,5$; G-150— $4,8$; G-200— $4,5$.

Разумеется, гели должны быть полностью набухшими, а суспензии — деаэрированы. Эти операции удобнее проводить с избытком жидкости, который затем отсасывают с осевшего на дно геля. При этом получается густая каша, почти без свободной жидкости над осадком.

Распределение кашицы геля ровным слоем по поверхности хорошо промытой стеклянной пластинки осуществляют с помощью формовочного приспособления («TLC-Spreader»). Это — гладкий стальной прутком диаметром 6 мм, по концам которого сделаны слегка выступающие над диаметром и эксцентрично расположенные квадратные фланцы. Опираясь на эти фланцы, прутком двигают вдоль стекла, на которое с некоторым избытком нанесена каша сефадекса. Зазор между стеклом и прутком определяет толщину остающегося слоя геля. Каждому из четырех возможных положений фланцев по отношению к стеклу соответствует своя толщина слоя геля ($0,4$; $0,6$; $0,8$ и $1,0$ мм).

После формирования слоя геля пластины помещают в прибор, заливают элюент в резервуары, погружают в них фитили и накладывают их равномерно на края пластины. Столик устанавливают под выбранным углом, закрывают крышку и дают пластинам уравниваться током элюента в течение ночи. Затем столик возвращают в горизонтальное положение; не снимая крышки, через прорезы в ней на поверхность геля микропипеткой (едва касаясь каплей поверхности) наносят препараты и, снова закрыв прорезы резиновыми вставками, возвращают столик прибора в наклонное положение. В один из треков фракционирования вносят окрашенное высокомолекулярное вещество. Когда его пятно достигнет конца пластинки, хроматографический процесс прерывают и пластинку извлекают для снятия с нее реплики на фильтровальную бумагу, как описано выше. Обычно процесс элюции занимает 5 — 10 ч.

После окраски пятен можно измерить расстояния от стартовой линии до центра каждого пятна и подсчитать значения R_F — отношения этих расстояний к максимальному расстоянию, пройденному заведомо высокомолекулярным веществом, мигрирующим вместе с подвижной фазой.

Значения R_F известных белков можно использовать для построения калибровочного графика, с помощью которого можно затем оценивать молекулярные массы исследуемых препаратов (с теми же ограничениями, которые были указаны для гель-фильтрации на колонках). График следует строить в координатах $\log M$ и $1/R_F$, тогда в нем появится такой же линейный участок, как в графиках зависимости $\log M$ от K_{av} . Действительно,

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0}.$$

Поскольку $V_t - V_0 = \text{const}$, т. е. $V_t - V_0 \sim V_0$, то можно записать, что $K_{av} \sim (V_R - V_0)/V_0$ и $K_{av} + 1 \sim V_R/V_0$. Но в теории было показано, что $V_R = V_0/R$, где R — фактор задержки ($R \leq 1$). В ТСХ и ТСГФ его обозначают R_F . Таким образом, $V_R/V_0 = 1/R_F$, а $K_{av} + 1 \sim R_F$. Очевидно, что если в зависимости $\log M = f(K_{av})$ есть прямолинейный участок, то он будет и в зависимости $\log M = f(1/R_F)$. График такой зависимости показан на рис. 84. R_F здесь подсчитывали для сефадекса G-150 «Superfine» по отношению к расстоянию миграции тиреоглобулина ($M \approx 650\,000$). Обратим внимание на то, что значения $1/R_F \gg 1$.

ТСГФ удобно использовать в качестве экономного пробного метода для выбора типа геля и скорости элюции при подготовке препаративной очистки белка гель-фильтрацией на колонке. Малое количество необходимого препарата и возможность одновременного исследования нескольких препаратов делает метод ТСГФ привлекательным и для клиники, где он может дополнить, а иногда и заменить электрофорез и электрофокусирование.

В качестве иллюстрации применения метода для исследовательских целей назовем работу Ханг и соавторов, где на пластинке сефадекса G-50 «Superfine» размером 20×40 см при толщине слоя 1,25 мм элюцией 6 М раствором гуанидинхлорида вели фракционирование пептидов и гликопептидов с молекулярными массами в диапазоне 1500—10 000. Препарат в объеме 5 мкл содержал от 30 до 100 мкг смеси пептидов. В качестве заведомо высокомолекулярного вещества (для определения R_F) брали бромциановый пептид α -лактальбумина с $M = 10\,500$ или цитохром с. Пластинка была наклонена под углом $7-8^\circ$; скорость элюции, определяемая по скорости движения окрашенного пятна высокомолекулярного вещества, составляла 1,7—1,9 см/ч, что соответствует скоростям элюции для колонок, выраженным в мл/см²·ч. Процесс фракционирования длился 16—18 ч. Реплику снимали на бумагу «Whatman 3MM», высушивали ее 15 мин при 60° , а затем опрыскивали 0,05%-ным раствором флюоресцамина в ацетоне (12 мл на пластину), снова высушивали при 60° в течение 5 мин и пятна пептидов отмечали при освещении пластины УФ-светом. Авторы работы строили зависимость $\log M$ от R_F (а не от $1/R_F$), однако для 13 известных им пептидов и 5 гликопептидов нашли примерно линейную зависимость (чем больше $\log M$, тем больше, т. е. ближе к единице, и R_F). Здесь нет катастрофического

противоречия, так как в некотором интервале значений R_F (вдалеке от $R_F = 0$) гиперболическая функция $1/R_F = f(R_F)$ имеет близкий к линейному характер [Hung et al., 1977].

В другой недавней работе методом ТСГФ обнаруживали и оценивали содержание в гомогенате молочной железы или ее опухоли белка-рецептора эстрогена. Он мигрировал в комплексе с радиоактивно меченным эстрадиолом. Авторы использовали нативные белки и мягкие условия хроматографии. Пластину размером 20×20 см, покрытую слоем сефадекса G-200 «Superfine» толщиной 2 мм, элюировали буфером, содержащим 0,01 М Трис-HCl (pH 7,4), 1,5 мМ ЭДТА и 1,5 мМ β -меркаптоэтанол. Объем препарата — 20 мкл. Наклон пластины в приборе фирмы «Pharmacia» ($10-20^\circ$) подбирали так, чтобы скорость элюции составляла 3 см/ч при температуре 4° . В качестве высокомолекулярного компонента вносили γ -глобулин, конъюгированный с флюоресцеинизотиоцианатом. Оказалось, что белок-рецептор выходит в свободном объеме вместе с γ -глобулином ($M \approx 250\,000$) [Hazato et al., 1979].

ЛИТЕРАТУРА

- Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование М.: Наука, 1981.
- Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983.
- Allende J. E., Allende C. C.—Meth. Enzymol., 1971, 20, p. 210—220.
- Ansari A. A., Mage R. G.—J. Chromatogr., 1977, 140, p. 98—102.
- Arlinghaus R., Heintz R., Schweet R.—Meth. Enzymol., 1968, 12B, p. 700—708.
- Bakayev V. V., Schmatchenko V. V., Georgiev G. P.—Nucl. Acids Res., 1979, 7, p. 1525—1540.
- Barden J. A.—Anal. Biochem., 1983, 135, p. 52—57.
- Belew M., Fohlman J., Janson J. C.—FEBS Lett., 1978, 91, p. 302—304.
- Britten R. J., Graham D. E., Neufeld B. R.—Meth. Enzymol., 1974, 29, p. 363—418.
- Bryce C. F. A., Crichton R. R.—J. Chromatogr., 1971, 63, p. 267—280.
- Bywater M., Bywater R., Hellman L.—Anal. Biochem., 1983, 132, p. 219—224.
- Calabro M. A., Holloway P. W.—Anal. Biochem., 1976, 71, p. 608—611.
- Calam D. H., Davidson J.—J. Chromatogr., 1981, 218, p. 581—590.
- Casey R., Rees M. W.—Anal. Biochem., 1979, 95, p. 397—400.
- Cox G. S.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, 98, p. 942—951.
- Dion A. S., Williams C. J., Pomenti A. A.—Anal. Biochem., 1977, 82, p. 18—28.
- Ekman R., Johansson B. G., Ravnskov U.—Anal. Biochem., 1976, 70, p. 628—631.
- Engel P. C.—Anal. Biochem., 1977, 82, p. 512—522.
- Fish W. W., Mann K. G., Tanford C.—J. Biol. Chem., 1969, 244, p. 4989—4994.
- Fish W. W., Reynolds J. A., Tanford C.—J. Biol. Chem., 1970, 245, p. 5166—5168.
- Gorray K. C., Quay W. B.—Anal. Biochem., 1977, 82, p. 69—75.
- Graeve L., Goemann W., Földi P., Kruppa J.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, 107, p. 1559—1565.
- Graeve L., Kruppa J., Földi P.—J. Chromatogr., 1983, 268, p. 506—510.
- Hazato T., Murayama A., Matsuzawa A., Yamamoto T.—Anal. Biochem., 1979, 94, p. 29—35.
- Hefti F.—Anal. Biochem., 1982, 121, p. 378—381.
- Holmes W. M., Hurd R. E., Reid B. R. et al.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1975, 72, p. 1068—1071.
- Hung C.-H., Strickland D. K., Hudson B. G.—Anal. Biochem., 1977, 80, p. 91—100.

- Jelenc P. C.*—Anal. Biochem., 1980, 105, p. 369—374.
- Jenson J. C., Chin-Lin P., Gerber-Jenson B., Litman G. W.*—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1980, 77, p. 1389—1393.
- Kapaciewicz W., Regnier F. E.*—Anal. Biochem., 1982, 126, p. 8—16.
- Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T.*—J. Chromatogr., 1980, 193, p. 29—36.
- Kawata H., Chase M. W.*—J. Chromatogr., 1968, 35, p. 565—566.
- Krauth W., Werner D.*—Biochim. et biophys. acta, 1979, 564, p. 390—401.
- Laurent T. C., Killander J.*—J. Chromatogr., 1964, 14, p. 317—330.
- Lazure C., Dennis M. Rochemont J.* et al.—Anal. Biochem., 1982, 125, p. 406—414.
- Le Maire M., Rivas E., Möller J. V.*—Anal. Biochem., 1980, 106, p. 12—21.
- Lin A. W.-S. M., Castell D. O.*—Anal. Biochem., 1978, 86, p. 345—356.
- Lurquin P. F., Tshitenge G., Delaunoy G., Ledoux L.*—Anal. Biochem., 1975, 65, p. 1—10.
- Mann K. G., Fish W. W.*—Meth. Enzymol., 1972, 26, p. 28—42.
- Meredith S. C., Nathans G. R.*—Anal. Biochem., 1982, 121, p. 239—243.
- Meyer H., Verhoef H., Hendriks F. F. A.* et al.—Biochemistry, 1979, 18, p. 3582—3588.
- Mikeš O.* Chromatographic and allied methods. Chichester: Ellis Horwood, 1979.
- Miller R. R., Peters S. P., Kuhlenschmidt M. S., Glew R. H.*—Anal. Biochem., 1976, 72, p. 45—48.
- Montelaro R. C., West H., Issel C. J.*—Anal. Biochem., 1981, 114, p. 398—406.
- Morris J. O. R., Morris P.* Separation methods in biochemistry. L.: Pitman Publ., 1976.
- Murakami-Murofushi K., Ratner S.*—Anal. Biochem., 1979, 95, p. 139—155.
- Nelson N. J., Traub P.*—J. Biol. Chem., 1982, 257, p. 5544—5553.
- Norgard M. V.*—Anal. Biochem., 1981, 113, p. 34—42.
- Person H., Perricoudet M., Tolun A.* et al.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 7999—8003.
- Porath J.*—Pure and Appl. Chem., 1963, 6, p. 233—244.
- Richter W. O., Jacob B., Schwandt P.*—Anal. Biochem., 1983, 133, p. 288—291.
- Rosbach M., Blank D., Fahrner K.* et al.—Meth. Enzymol., 1979, 68, p. 454—469.
- Roumeliotis P., Unger K. K.*—J. Chromatogr., 1979, 185, p. 445—452.
- Roumeliotis P., Unger K. K.*—J. Chromatogr., 1981, 218, p. 535—546.
- Sabol S., Ochoa S.*—Meth. Enzymol., 1974, 30, p. 39—44.
- Sain B., Erdei S.*—Anal. Biochem., 1981, 110, p. 128—130.
- Schreus V. V. A. M., Boekholt H. A., Koopmanschap R. E.*—J. Chromatogr. 1983, 254, p. 203—210.
- Siegel L. M., Monty K. J.*—Biochim. et biophys. acta, 1966, 112, p. 346—362.
- Swergold G. D., Rubin C. S.*—Anal. Biochem., 1983, 131, p. 295—300.
- Tai P.-C., Davis B. D.*—Meth. Enzymol., 1979, 59, p. 362—371.
- Takanami M.*—Meth. Enzymol., 1967, 12, p. 491—494.
- Ui N.*—Anal. Biochem., 1979, 97, p. 65—71.
- Vaisius A. C., Horgen P. A.*—Biochemistry, 1979, 18, p. 795—803.
- Vassali P., Tedghi R., Lisowska-Bernstein B.* et al.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1979, 76, p. 5515—5519.
- Von Stetten O., Schlett R.*—J. Chromatogr., 1981, 218, p. 591—596.
- Währner U.*—FEBS Lett., 1981, 129, p. 185—187.
- Watabe S., Hashimoto K., Takamatsu T.*—J. Chromatogr., 1983, 260, p. 210—215.
- Wehr C. T., Abbott S. R.*—J. Chromatogr., 1979, 185, p. 453—462.
- Wilgus H., Stellwagen E.*—Anal. Biochem., 1979, 94, p. 228—230.

РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ВВОДНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Термин «распределительная жидкостная колоночная хроматография», строго говоря, предполагает наличие двух жидких фаз, неподвижной и подвижной, при том, что неподвижность одной из них обусловлена ее связью с твердой матрицей, заполняющей хроматографическую колонку. Этот вид хроматографии базируется на явлении растворимости. По самой сути хроматографического процесса компоненты фракционируемой смеси веществ должны быть лучше растворимы в неподвижной фазе, чем в подвижной ($K > 1$). Если при этом неподвижная фаза водная, а подвижная фаза представлена органическим растворителем или водно-органической смесью, вещества в целом гидрофильны и разделение идет по степени этой гидрофильности, то распределительную хроматографию принято называть «нормальнофазовой» (НФХ). Движение хроматографических зон по колонке и элюция пиков подвижной фазой происходят в направлении от менее гидрофильных к более гидрофильным компонентам смеси. При изократической элюции последние лишь понемногу и с трудом диффундируют от неподвижной водной фазы в подвижную. Для ускорения их элюции можно постепенно (градиентно) увеличивать полярность подвижной фазы, например уменьшая в ней содержание органического растворителя в пользу воды.

Термин «обратнофазовая распределительная жидкостная хроматография», или, как принято говорить, «хроматография в обращенных фазах» (ХОФ; по-английски RPC — «reverse phase chromatography»), подразумевает обратную картину. Неподвижная жидкая фаза представлена в этом случае органическим растворителем или малополярной водно-органической смесью, а подвижной фазой служит водный раствор буфера или аналогичная смесь, но с большей полярностью, чем у неподвижной фазы. Очевидно, что такая система предназначена для хроматографии веществ, в целом гидрофобных, и фракционирование компонентов смеси идет по степени их гидрофобности.

У различных аминокислот гидрофобные или гидрофильные свойства выражены сильнее или слабее в соответствии с химической природой радикалов, входящих в их состав. Гидрофобность или гидрофильность пептидов определяется их аминокислотным составом. Поверхность глобул большинства нативных белков цитоплазмы в целом гидрофильна, так как остатки гидрофобных аминокислот спрятаны внутрь глобул. У белков мембран, наоборот, гидрофобные остатки аминокислот располагаются на поверхности. Впрочем,

у белков цитоплазмы на поверхности глобул тоже могут располагаться гидрофобные участки, что, как мы увидим, используется в процессе хроматографии. Денатурация большинства белков приводит к увеличению гидрофобности их поверхности за счет экспонирования ранее недоступных для растворителя остатков гидрофобных аминокислот. Гидрофобность гетероциклических нуклеиновых оснований выражена хорошо (у пуринов сильнее, чем у пиримидинов). Нуклеозиды, а тем более нуклеотиды и нуклеиновые кислоты более гидрофильны за счет остатков сахаров и (особенно) фосфорной кислоты. Однако сильно выраженную гидрофильность последней можно блокировать с помощью так называемых «жирных» катионов. Общеизвестно, например, что цетавлон осаждает нуклеиновые кислоты из водных растворов. Вообще следует иметь в виду, что внесением в жидкую фазу денатурирующих агентов, ионов, детергентов и других добавок можно изменять степень гидрофобности или гидрофильности фракционируемых веществ как за счет упомянутой блокировки соответствующих функций, так и за счет изменения третичной структуры биополимеров в результате их денатурации. Ионные добавки могут изменять и свойства самого растворителя, например связывать воду, чем обусловлен известный эффект уменьшения растворимости белков в крепких солевых растворах — «высаливание». Ряд катионов проявляет так называемый «хаотропный» эффект — они разрушают упорядоченную структуру воды, что приводит к ослаблению гидрофобных взаимодействий находящихся в водном окружении молекул. Такой эффект нарастает в следующем ряду катионов: NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} . Из этого ряда наиболее интересен Li^+ ввиду высокой растворимости его солей в воде. Существенную роль в нейтрализации гидрофильных заряженных групп вещества может играть изменение рН жидкой фазы. Таким образом, имеется обширный арсенал средств управления как степенью гидрофобности или гидрофильности вещества, так и полярностью, а следовательно, и растворяющей способностью элюента или жидкости неподвижной фазы. Это открывает разнообразные возможности для осуществления распределительной хроматографии.

Отметим одно существенное преимущество обратнофазовой хроматографии для фракционирования белков, НК и их компонентов. При такой распределительной хроматографии эти вещества выходят из колонки растворенными в элюенте, основу которого составляет вода, что способствует сохранению их нативности и облегчает дальнейшие процедуры. Кроме того, использование перечисленных выше средств управления гидрофобностью или гидрофильностью вещества в случае водного элюента значительно упрощается.

Распределительная жидкостная хроматография имеет один немаловажный недостаток. Дело в том, что неподвижную жидкую фазу трудно длительное время удерживать в связи с твердым носителем. Постепенно она вымывается элюентом, и эффективность хроматографической системы снижается. Поэтому в последние годы получили широкое распространение методы химической модификации поверхности твердой матрицы носителя, на которой фиксируется слой гид-

рофобных (ХОФ) или гидрофильных (НФХ) молекул. Вместо предпочтительного растворения (например, для ХОФ) в неподвижной жидкой фазе имеет место прямое гидрофобное взаимодействие молекул вещества с органическими молекулами алифатической или ароматической природы, фиксированными на поверхности твердой матрицы. Взаимодействие происходит в водной или водно-органической жидкой среде. Если, как нередко бывает, в хроматографическом процессе участвует только наружная поверхность химически модифицированных гранул носителя, то этой средой является сама подвижная фаза элюента. Если же поры в гранулах достаточно крупные и гидрофобное взаимодействие вещества с модифицированной поверхностью матрицы происходит по всему их объему, то жидкая полярная среда того же состава, что и элюент, оказывается здесь иммобилизованной и ее следовало бы считать тоже неподвижной фазой в том смысле, какой придается этому понятию при гель-фильтрации. Однако значения коэффициента распределения (K) при гель-фильтрации близки к единице, тогда как гидрофобное взаимодействие молекул вещества с гидрофобизированной поверхностью матрицы обеспечивает $K \gg 1$, что позволяет пренебрегать «эффектом гель-фильтрации» в описываемом методе хроматографии. Этот метод лишь условно можно отнести к распределительной хроматографии, поэтому, описывая его в данной главе после истинно распределительной хроматографии в обращенных фазах (ХОФ), мы будем именовать его методом «обратнофазовой гидрофобной хроматографии». Аналогичный термин «нормальнофазовая гидрофильная хроматография» не фигурирует в нашем рассмотрении, поскольку возможный вариант гидрофильного взаимодействия вещества с поверхностью матрицы в среде органического растворителя в колоночной хроматографии биологических молекул не применяется.

НОРМАЛЬНОФАЗОВАЯ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Нормальнофазовое хроматографическое распределение лежит в основе многих вариантов тонкослойной хроматографии, рассматриваемых в гл. 9. В колоночной хроматографии при обычных давлениях из-за отмеченных выше преимуществ ХОФ нормальнофазовая распределительная хроматография применяется крайне редко. Ввиду этого мы ограничимся одним недавним примером.

Овенс и Динер разделяли одонитевую РНК («ssRNA») и двунитевую форму РНК («dsRNA») одного из вирусов картофеля на колонке волокнистой целлюлозы CF-11. Суммарную РНК из листьев растения извлекали фенолом, ДНК разрушали ДНКазой, полисахариды удаляли экстракцией 2-метоксиэтанолом и очищенную таким образом РНК фракционировали осаждением 2 М LiCl. Вирусная РНК оказывалась в супернатанте. Ее переводили в 50 %-ный раствор этанола в буфере, содержащем 0,05 М Трис-HCl (pH 7), 0,4 М NaCl и 1 мМ ЭДТА, и вносили на колонку целлюлозы, уравновешенной тем

же раствором. После промывки ssRNA элюировали 17,5%-ным раствором этанола в том же буфере, а dsRNA — водой. Очевидно, что однонитевая РНК более «склонна» к растворению в водно-спиртовой смеси, чем двунитевая, и за счет этого может быть отделена элюцией относительно разбавленным спиртовым раствором [Owens, Diener, 1982].

РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В ОБРАЩЕННЫХ ФАЗАХ

РАЗДЕЛЕНИЕ тРНК В СИСТЕМЕ ХОФ-5

Пионерскими в использовании ХОФ для фракционирования тРНК были работы Келмерса и соавторов, опубликованные в начале 70-х годов. Они начали с системы, получившей обозначение «ХОФ-2» (RPC-2). В качестве твердой матрицы был выбран кизельгур марки «Chromosorb W», поверхность которого силикопировали. Неподвижная жидкая фаза была представлена пленкой тетрафтортетрахлорпропана («Freon 214»), сорбированной на гидрофобизированной поверхности кизельгура. В пленке была растворена соль жирного амина — трикаприлметиламмонийхлорида («Aliquat 336»). Назначение этой водонерастворимой соли состояло в том, чтобы блокировать гидрофильность остатков фосфорной кислоты в тРНК, — получалась трикаприлметиламмониевая соль тРНК, хорошо растворимая во фреоне. Элюцию вели градиентом нарастающей концентрации NaCl (0,2—0,36 М) в 0,01 М Трис-HCl (pH 7), содержавшем по 10 мМ MgCl₂ и β-меркаптоэтанол [Kelmers et al., 1971]. По мере увеличения содержания ионов Na⁺ в элюенте они вытесняли жирный амин, переводя тРНК в натриевую соль, хорошо растворимую в воде. Благодаря неодинаковой гидрофобности нуклеиновых оснований молекулы различных тРНК выходили в подвижную водную фазу поочередно, и тем самым осуществлялось их фракционирование по составу (и конформации, которая также влияет на характер растворимости тРНК).

В этой же системе проводили фракционирование различных аминоксил-тРНК. Аминокислоты давала свой вклад гидрофобности, так что для элюции приходилось использовать градиент 0,35—1 М NaCl в ацетатном буфере с pH 4,5. Кислая среда здесь необходима для предотвращения снятия аминокислот с тРНК. Этим же методом удавалось разделять изоакцепторные фракции тРНК [Waters, Novelli, 1971; Yang, Novelli, 1971].

Система Келмерса претерпела вскоре ряд модификаций, пока не трансформировалась в получившую широкое распространение и используемую до сих пор систему ХОФ-5 (RPC-5) [Pearson et al., 1971]. Имеет смысл познакомиться с ней на недавнем примере. Вместо силикопированного кизельгура в качестве гидрофобной матрицы в системе ХОФ-5 используют полихлортрифторэтилен («Plaskon 2300 STFE») со средним размером частиц 10 мкм. 12 мл трикаприлмоноаммоний хлорида («Adogen 464») растворяли в 450 мл хлоро-

форма и медленно перемешивали в течение 1—2 ч с 300 г пласкона. Затем хлороформ удаляли, продувая через смесь сухой азот. На поверхности пласкона образовывалась тонкая жидкая пленка адогена. Матрицей, суспендированной в равном объеме начального буфера, под давлением до 30 атм заполняли колонку размером $0,64 \times 20$ см с термостатирующей рубашкой. Смесь аминоксил-тРНК вносили в начальный буфер и элюировали при том же давлении и температуре 25° линейным градиентом (100 мл) NaCl в 0,01 M CH_3COONa (pH 4,5) с 10 mM MgCl_2 и 0,4 mM ДТТ. Для Glu-, Phe-, Cys-, Pro- и Leu- тРНК использовали градиент 0,5—0,8 M NaCl; для Ile-тРНК — 0,45—0,65 M, а для всех остальных аминоксил-тРНК — 0,4—0,7 M. Скорость элюции составляла около 350 мл/см²·ч, что допустимо, поскольку хроматография идет только в пленке на поверхности пласкона. Всего для 20 аминоксил-тРНК удалось разделить 77 фракций изоакцепторных тРНК [Hampel, Ruefer, 1979].

Фракции разделяются за счет небольших различий в гидрофобности между изоакцепторными тРНК при практически одинаковых размерах их молекул. Такая трактовка может вызвать сомнения, которые, однако, должен рассеять следующий наглядный пример. У многих организмов некоторые тРНК третьего столбца кодовой таблицы (специфичные для Tyr, His, Asn и Asp) в первом положении антикодона имеют модифицированное основание Q. Его структура напоминает гуанин, к которому по 7-му положению присоединен (через цепочку $-\text{CH}_2-\text{NH}-$) еще один пятиуглеродный замкнутый цикл с двойной связью и *цис*-диольной комбинацией гидроксильных групп при двух соседних атомах углерода. Обработка периодатом натрия приводит к разрыву кольца и окислению гидроксильных групп до альдегидных. Это несколько увеличивает гидрофобность всего лишь одного основания Q, однако такого изменения оказывается достаточно, для того чтобы заметным образом изменить положение соответствующих тРНК в системе ХОФ-5 [Wosnick, White, 1979].

При подготовке матрицы для ХОФ-5 можно обойтись и без хлороформа. Было предложено суспендировать 14 мл адогена 464 прямо в 500 мл начального буфера (0,4 M NaCl в 0,01 M CH_3COONa , pH 4,4) с помощью гомогенизатора «Warring-blendor» в течение 5 мин при комнатной температуре, потом добавить туда 300 г пласкона и суспендировать еще 10 мин, а затем обильно промыть тем же буфером на бюхнеровской воронке [Heckman et al., 1979].

Готовую матрицу для ХОФ-5 одно время производила фирма «Miles», затем ее выпуск прекратился в связи со снятием с производства пласкона 2300. В это же время ослаб и интерес к фракционированию тРНК. Однако, как оказалось, системе ХОФ-5 предстояло второе рождение. В самые последние годы были продемонстрированы ее большие возможности для фракционирования рестриктов ДНК и очистки плазмид (см. ниже). На это немедленно откликнулась фирма «BRL», которая в августе 1981 г. (журнал «Nucleic Acids Research» № 15) сообщила о выпуске аналогичной по своим свойствам матрицы под торговым названием «RPC-5 ANALOG» именно для целей геной инженерии.

Между тем был найден способ обойти возникшее затруднение и лабораторными средствами. Недавно Новак и соавторы описали приготовление матрицы для ХОФ-5, в которой вместо пласкона был использован липофильный сефадекс LH-20 фирмы «Pharmacia». 20 г этого сефадекса суспендировали в течение ночи в 200 мл ацетона, затем медленно при перемешивании добавляли 200 мл 0,5%-ного раствора адогена 464 в ацетоне, перемешивали 3 ч, добавляли 200 мл воды и снова перемешивали в течение ночи. Большую часть ацетона выпаривали на водяной бане, а остатки отмывали уже в колонке исходным буфером для фракционирования (весьма успешного) изоакцепторных тРНК [Nowak et al., 1979].

Следует отметить, что хроматография в системе ХОФ-5 является мягким способом фракционирования и очистки, по крайней мере в случае РНК. Известно, например, что нативная РНК фага MS-2, кодирующая только три белка (оболочки фага, репликазы и белок А) в опытах *in vitro* ведет инициацию их синтеза в пропорции 70 : 25 : 5. После мягкой тепловой денатурации РНК эти синтезы иницируются уже с одинаковой скоростью, что можно объяснить утратой специфической третичной организации молекулы фаговой РНК. Оказалось, что после очистки в хроматографической системе ХОФ-5 РНК фага MS-2 полностью сохранила нативные пропорции инициации указанных выше синтезов. То же самое было показано и для РНК фага Q β [Campbell et al., 1980].

РАЗДЕЛЕНИЕ ДНК В СИСТЕМЕ ХОФ-5

Еще в 1978 г. было описано фракционирование по длине набора рестриктных фрагментов двунитевой ДНК размерами от 43 до 1400 пар оснований на колонке $0,9 \times 105$ см, куда вносили до 7 мг ДНК. Элюцию вели линейным градиентом 0,48—0,7 М NaCl (в обычном буфере), растянутым на 1,6 л ($24 V_t$), со скоростью 150 мл/см 2 ·ч, при давлении 25 атм. Там же было показано, что система ХОФ-5 в щелочной среде (12 мМ NaOH) с помощью пологого градиента KCl позволяет разделить комплементарные нити денатурированных фрагментов ДНК [Eshaghpour, Crothers, 1978].

Ларсон и соавторы в аналитических опытах на микроколонке ($0,15 \times 10$ см) исследовали оптимальные условия для фракционирования рестриктных ДНК в системе ХОФ-5 при среднем давлении (~ 33 атм) и скорости элюции 13 мл/ч. Наилучшее разделение 17 фрагментов размерами от 43 до 850 пар оснований получалось у них при использовании очень пологого линейного градиента (0,55—0,75 М KCl) объемом 40 мл ($220 V_t$) в нейтральном буфере при температуре 43°. Повышение температуры, по их данным, затрудняет элюцию ДНК и растягивает ее профиль. Удастся разделить фрагменты длиной 98 и 102 пары оснований, чего далеко не всегда можно добиться с помощью электрофореза. Длина «липких» концов рестриктов и их состав влияют на разделение, равно как и нуклеотидный состав ДНК и даже последовательность оснований. Подчеркивается необ-

ходимость поддержания стерильности: все растворы фильтровали через миллипоровые фильтры, а посуду и обменник хранили в 0,06%-ном растворе азида натрия [Larson et al., 1979].

Бина и соавторы расщепили меченную ^3H -тимидином ДНК вируса SV-40 обработкой рестриктазой Alu I на 34 фрагмента размером от 7 до 775 пар оснований. 1 мг смеси этих фрагментов в 10 мл 0,2 М раствора NaCl, содержащего 0,05 М Трис-HCl (pH 7,5) и 1 мМ ЭДТА, загружали на препаративную колонку ($1,6 \times 90$ см), заполненную матрицей для ХОФ-5 при давлении 40 атм. После предварительной промывки тем же раствором элюцию вели быстро при таком же давлении крутым градиентом (0,5—0,7М NaCl) в объеме 600 мл ($\sim 3,5 V_t$). Картина распределения фрагментов показана на рис. 85. Видно, что даже при таком «скоростном» фракционировании ряд фрагментов ДНК выходит, хорошо отделившись от других. Неразрешенные участки элюата можно расфракционировать в той же системе, но с помощью пологого градиента NaCl. Авторы замечают, что в отличие от фрагментов, экстрагируемых после электрофореза из ПААГ или гелей агарозы, здесь нет примесей, ингибирующих ферменты последующей обработки ДНК,— фосфатазу, обратную транскриптазу, полинуклеотидкиназу и рестриктазы [Bina et al., 1981]. Препаративное разделение небольшого числа фрагментов ДНК недавно описано в работе Хиллена и др. [Hillen et al., 1981].

В обзорной статье Уэлса и соавторов, опубликованной в одном из последних выпусков «Methods in Enzymology», подводятся итоги первых опытов использования системы ХОФ-5 для фракционирования ДНК и намечаются дальнейшие перспективы. Авторы указывают, что этот метод позволяет успешно разделять одонитевые фрагменты ДНК и РНК градиентом 0,1—1М KCl в 12 мМ NaOH (pH 12), многочисленные рестриктные фрагменты ДНК в аналитическом и препаративном вариантах, как было описано выше (причем даны подробные рекомендации), комплементарные нити даже небольших фрагментов ДНК в щелочной среде путем элюции пологим градиентом KCl. Например, градиентом 0,9—0,95 М KCl в 12 мМ NaOH комплементарные нити одного из фрагментов ДНК фага ФХ 174 длиной 240 пар оснований с запасом разделяются на микроколонке ХОФ-5 ($0,15 \times 20$ см) при объеме градиента 20 мл ($55 V_t$) и скорости элюции 0,23 мл/мин (780 мл/см²·ч), т. е. менее чем за 1,5 ч, при умеренном давлении около 10 атм.

Авторы называют следующие ближайшие перспективы фракционирования ДНК в системе ХОФ-5:

1. Выделение миллиграммовых количеств ДНК определенных участков генома — операторов, промоторов и др. Отмечается, что регуляторные участки ДНК сильнее связываются с матрицей в системе ХОФ-5.

2. Разделение фрагментов ДНК одинаковой длины, но различного нуклеотидного состава (что невозможно при электрофорезе), в частности отделение АТ-богатых фрагментов, которые сильнее задерживаются в системе ХОФ-5.

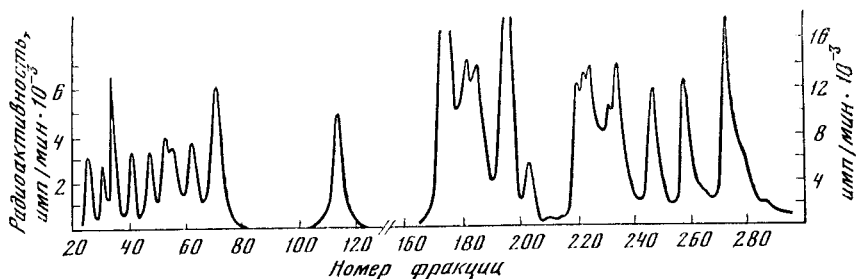


Рис. 85. Разделение AluI-фрагментов ^3H -меченой ДНК вируса SV-40 в системе ХОФ-5 [Bina et al., 1981]

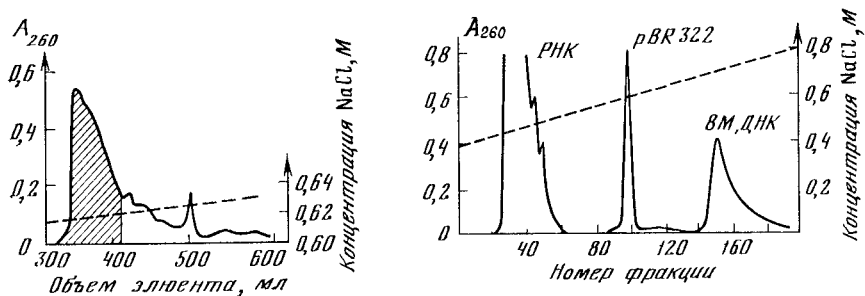


Рис. 86. Очистка ДНК плазмиды Col E1 в системе ХОФ-5 (элюция — пологим градиентом концентрации NaCl) [Best et al., 1981]

Рис. 87. Очистка ДНК плазмиды pBR 322 в системе ХОФ-5 (по данным фирмы «BRL»)

«ВМ ДНК» — высокомолекулярная ДНК

3. Разделение фрагментов ДНК одинаковой длины, различающихся между собой только наличием или отсутствием «лишних» концов.

4. Одновременное разделение большого количества (50—60) олигонуклеотидов, в то время как на ДЭАЭ-целлюлозе обычно удается разделить не более 15 олигонуклеотидов.

Предположительно называются и более отдаленные перспективы:

1. Разделение молекул ДНК, отличающихся друг от друга небольшим числом неспаренных оснований.

2. Отделение молекул ДНК, имеющих разрывы («nicks») или пропуски («gaps») в одной из двух нитей.

3. Выделение области «вилки» репликации ДНК.

4. Разделение молекул ДНК, находящихся на разных промежуточных этапах транскрипции или рекомбинации.

5. Выделение кольцевых ДНК с различным числом витков сверхскручивания.

Даже если отнести к оптимизму авторов с некоторой осторожностью, ясно, что метод фракционирования в системе ХОФ-5 в связи с исследованиями ДНК переживает сейчас свое второе рождение [Wells et al., 1980].

Большой практический интерес для генной инженерии представляет возможность очистки в системе ХОФ-5 сверхскрученной плазмидной ДНК. Так, Бест и соавторы вели препаративную очистку плазмиды Col E1 на колонке $0,6 \times 90$ см пологим градиентом $0,6—0,65$ М NaCl в нейтральном буфере со скоростью 130 мл/см²·ч при умеренном давлении (12 атм). Хроматографический профиль, полученный через 13 ч, показан на рис. 86. Существенно отметить, что материал в заштрихованной части пика на $80—90\%$ состоит из сверхскрученной ДНК [Best et al., 1981]. Картинка, приложенная к упомянутой выше рекламе фирмы «BRL» (Nucl. Acids Res., 1981, 9, № 15), выглядит еще убедительнее (рис. 87). Здесь можно было опустить операцию обработки бактериального лизата РНКазой, что, как упоминалось, приводит к заметному числу разрывов молекулы, ДНК, по-видимому, за счет фрагментов РНК, встроенных в ДНК во время амплификации плазмид хлорамфениколом. Недавно описано фракционирование в системе ХОФ-5 (на колонке 1×50 см) 100 мг фрагментированной с помощью рестриктазы EcoR1 суммарной ДНК печени дышленка. Фракционирование вели с целью отделения фрагментов, несущих ген β -глобина (элюция — градиентом $1,5—1,8$ М CH_3COONa) [Day et al., 1981].

Примерно такие же условия элюции с колонки ХОФ-5 были использованы для отделения ДНК, обогащенной генами, кодирующими тРНК, из тринуклеосом зародыша дышленка. Здесь авторы использовали известный факт повышенного содержания ГЦ-пар в этих генах. В ДНК интеркалировали высокогидрофобный краситель «Phenyl Neutral Red» (PNR), который «охотнее» взаимодействует с ГЦ-богатыми участками ДНК. Одновременно с ростом концентрации CH_3COONa ($1,4—1,75$ М) в элюенте снижали концентрацию PNR от 1 мг/мл до нуля. Профиль ДНК растягивался так, что в последнюю очередь с колонки выходили фракции, обогащенные генами тРНК, которые можно было детектировать путем гибридизации с мечеными индивидуальными тРНК [B. Wittig, S. Wittig, 1979].

ОБРАТНОФАЗОВАЯ ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРИ НИЗКОМ ДАВЛЕНИИ

НЕМОДИФИЦИРОВАННАЯ СЕФАРОЗА. ЭЛЮЦИЯ СНИЖАЮЩИМСЯ ГРАДИЕНТОМ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛИ

Еще в 1975 г. было обнаружено, что тонкое разделение [³H]Leu-тРНК на пять изоакцепторных фракций удастся осуществить на колонке сефарозы 4В в «обратном градиенте» сульфата аммония (SA). Колонку размером $1,5 \times 40$ см уравнивали $0,01$ М Na-ацетатным буфером с pH 4,5, содержащим, кроме обычных добавок (Mg^{2+} и др.), еще и $1,3$ М $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. На колонку вносили 100 мг суммарного препарата тРНК E. coli и вели элюцию 500 мл того же

буфера, в котором концентрация СА линейно снижалась до нуля [Holmes et al., 1975]. Этот способ, очевидно, прошел надежную апробацию, поскольку описанный эксперимент одним из соавторов был недавно снова опубликован в сборнике «Methods in Enzymology» [Hatfield, 1979]. Примерно в то же время метод был использован другой группой авторов для фракционирования 700 мг тРНК на колонке размером $2,3 \times 75$ см [Colantuoni et al., 1979]. Позднее он вслед за ХОФ-5 фигурировал при очистке супрессорной тРНК [Waldron et al., 1981]. По-видимому, в этом случае имеет место не распределительная жидкостная хроматография, а гидрофобное взаимодействие молекул тРНК с самой матрицей агарозы (вспомним сужение пор и проявление гидрофобности агарозы при кислых значениях pH в крепких солевых растворах — см. гл. 2); поэтому рассматриваемый метод следует отнести к категории обратнотазовой гидрофобной хроматографии. Высокая концентрация соли связывает воду, снижает растворимость тРНК в элюенте и способствует ее гидрофобному связыванию с матрицей. Постепенное снижение концентрации СА обеспечивает поочередный в порядке возрастания гидрофобности переход молекул различных тРНК в элюент.

Механизм такого фракционирования тРНК был подробно исследован Спенсером [Spencer, 1982a, b; Spencer, Binns, 1982]. Концепции чисто гидрофобного взаимодействия с сефарозой противоречил отмеченный еще Моррисом факт ухудшения связывания тРНК с увеличением температуры [Morris, 1978]. Кроме того, Спенсер обнаружил, что форма профиля элюции, и в частности порядок выхода из колонки индивидуальных тРНК, существенно зависит от длины колонки и крутизны снижения солевого градиента, что не позволяет ограничиться представлением о последовательной их десорбции с сефарозы. Кроме того, при крутом градиенте в момент выхода тРНК из колонки концентрации СА может снизиться до 0,1 М, а при пологом — отказаться порядка 0,85 М (начальная концентрация в обоих случаях 1,3 М). Это говорит об отставании десорбированных молекул тРНК от элюента, т. е. об их адсорбционных взаимодействиях с матрицей в ходе миграции по колонке — различных для разных индивидуальных тРНК. Накопец, было замечено, что при внесении препарата в верхней части колонки образуется зона полупрозрачного осадка тРНК.

Все это заставило предположить участие во фракционировании двух механизмов: осаждения тРНК на границе фаз за счет высаливания (отсюда необходимость закисления элюента — нейтрализации зарядов фосфатов тРНК) и адсорбционной (скорее всего — гидрофобной) хроматографии. Соотношение растворимостей индивидуальных тРНК иное, чем сил их адсорбционных взаимодействий с матрицей, что и обуславливает изменение профиля элюции в зависимости от длины колонки. При повышении температуры высаливание и первоначальное осаждение тРНК затрудняются, а торможение миграции за счет гидрофобных взаимодействий с матрицей усиливается. Кроме того, оказалось, что характер фракционирования изменяется от партии к партии сефарозы, хотя и очень хорошо вос-

производится для данной партии. Это обстоятельство было отмечено также и Пателем с соавторами [Patel et al., 1982].

Проведенное Спенсером физико-химическое исследование четырех партий сефарозы не выявило других причин различия их хроматографических характеристик, кроме трудно объяснимой корреляции степени адсорбционного задержания тРНК с уменьшением среднего диаметра гранул. К сожалению, партии сефарозы последних лет выпуска хуже задерживают тРНК в ходе миграции, что приводит к менее эффективному ее фракционированию. Из данных Спенсера следуют два практических вывода: необходимость подбирать партию сефарозы и возможность оптимизации фракционирования за счет вариации его параметров (длины колонки, температуры и pH буфера, начальной концентрации СА и крутизны ее градиента).

Аналогичная операция фракционирования белков на сефарозе 4В в снижающемся градиенте концентрации сульфата аммония была использована для очистки Phe-тРНК- и Pе-тРНК-синтетаз из дрожжей [Von der Naag, 1976]. Интересно отметить, что выбранная автором начальная концентрация СА (50% от насыщающей) в свободном растворе еще не высаливает белки. Однако при нанесении на колонку, уравновешенную этим раствором соли, белки выпадают в осадок, образуя, вероятно, мономолекулярный слой на сефарозе. Это заметно по помутнению верхнего участка геля. На 1 мл сефарозы, таким образом, «садились» около 40 мг белка. Элюция линейным снижающимся градиентом концентрации СА (50—15% от насыщения) снимала сначала балластные белки, а потом одну за другой указанные синтетазы.

В 1975 г. Попович описал разделение рибосомальных 18S и 28S РНК на колонке, заполненной гранулами 2%-ного геля агар. Агар расплавляли и после охлаждения измельчали в блендоре (600 об/мин) до гранул размером 60—200 МЕШ. Ими заполняли колонку и уравнивали ее буфером (0,02 М трис-НСl, pH 7,5, с 0,1% ДДС-Na и 2,5 мМ ЭДТА). В этом же буфере с различными добавками NaCl и проводили все дальнейшие опыты. Оказалось, что по мере увеличения концентрации NaCl агар приобретает способность связывать все большее количество суммарной РНК, вплоть до 0,35 мг на 1 мл геля. Можно думать, что эта связь осуществляется за счет описанных выше гидрофобных взаимодействий. Далее выяснилось, что 18S и 28S РНК связываются с агаром по-разному — вторая из них — значительно легче, при меньших концентрациях соли (рис. 88). Связывание 28S РНК с агаром резко усиливается в интервале 0,4—0,7 М NaCl, а в 1 М NaCl оно достигает максимума. В то же время 18S РНК в присутствии 1 М NaCl только начинает «садиться» на агар, а при концентрации 2 М связывание достигает 80%. Было также отмечено, что при закислении среды до pH 5 сорбция 28S РНК еще более усиливается (достигает 90% уже в 0,5 М NaCl), а для 18S РНК остается без изменения. Из изложенного вытекает простой способ препаративного разделения двух типов РНК на агаровой колонке. Смесь их вводят в 0,7 М растворе NaCl. 18S РНК выходит из колонки отдельным пиком, лишь незначительно задерживаясь на

ней, тогда как 28S РНК сорбируется полностью, и ее можно элюировать отдельным пиком с помощью 0,1 М раствора NaCl в том же буфере. На агаровой колонке объемом в 200 мл легко разделяли 3 мг рРНК печени крысы [Popović, 1975].

Позже был описан аналогичный метод разделения 28S и 18S рибосомальных РНК на колонках, заполненных нитроцеллюлозой типа «Nitrocel S» фирмы «Serva» [Popović, 1982]. Недавно Попович и Винтцерис исследовали влияние на характер задержания РНК на нитроцеллюлозе выбора соли и температуры элюента, а также провели сопоставление возможностей использования для рассматриваемого разделения различных полисахаридных матриц: агара, агарозы и нитроцеллюлозы. В случае рРНК из печени крысы емкость и разделяющая способность нитроцеллюлозы оказались хуже, чем агара и агарозы, зато для рибосомальных РНК из растений и микроорганизмов картина меняется на обратную. Отсюда вытекает необходимость выбора сорбента для каждого конкретного случая разделения 28S и 18S РНК [Popović, Wintzerith, 1983].

По-видимому, именно гидрофобности 28S РНК можно приписать и тот факт, что 60S субъединицы рибосом значительно легче связываются с сефарозой 4В, чем 40S субъединицы. При концентрации 0,3 М KCl и температуре 4° 60S субъединицы задерживаются сефарозой на 90%, а связывание 40S субъединиц достигает 60% лишь в 1 М KCl (увеличивать концентрацию KCl далее нельзя, так как начинается депротеинизация субъединиц). Полисомы в 0,3 М растворах KCl или NaCl практически полностью задерживаются сефарозой. Таким образом, например, можно выделить свободные полисомы из микросомальных фракций. При такой концентрации соли тРНК на сефарозе еще не задерживается [Petrović et al., 1978].

Этот же принцип недавно был использован для разделения 40S и 60S субъединиц рибосом на колонках сефарозы 4В или биогеля А-15m в солевом растворе неизменной концентрации (0,5 М KCl) с помощью изменения температуры. При 4° и указанной концентрации KCl 40S субъединицы очень слабо задерживаются агарозой и выходят четким пиком. Объем элюции лежит примерно посередине между свободным и полным объемами колонки. Затем при той же температуре вымывается пурамицин, использованный для диссоциации рибосом. Для снятия с колонки 60S субъединиц оказывается достаточным повысить температуру элюента до 35° — субъединицы выходят четким пиком [K. Manchester, J. Manchester, 1980].

Сопоставляя эту работу с предыдущей, можно отметить большое влияние температуры на прочность сорбции (60S субъединицы).

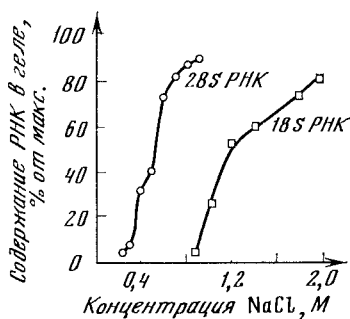


Рис. 88. Связывание 18S и 28S РНК в геле агара в зависимости от концентрации NaCl [Popović, 1975]

Такое влияние вообще характерно для гидрофобных взаимодействий — с повышением температуры (уменьшением внутренней упорядоченности) водного растворителя эти взаимодействия ослабевают.

ГИДРОФОБИЗИРОВАННЫЕ ГЕЛИ АГАРОЗЫ

Эффективность гидрофобной хроматографии на агарозе повышается, если ее поверхность модифицируют закреплением на ней гидрофобных молекул. Ими могут быть алкильные цепи различной длины (например, бутил-, гексил- и октилагароза) или такие же цепи, несущие на конце аминогруппу — соответственно ω -аминобутил-, ω -аминогексил- или ω -аминооктилагароза (буква ω означает, что NH_2 -группа стоит на конце линейной углеводородной цепи). Все эти и некоторые другие аналогичные производные агарозы выпускает фирма «Miles». При хроматографии на аминоалкилагарозах наряду с гидрофобными взаимодействиями во фракционировании белков участвуют, по-видимому, также и ионные. На 1 мл набухшего геля приходится 15—20 мкмоль алкильных заместителей, что позволяет сорбировать до 10 мг белка. Фирма обращает внимание потребителей на то, что связи между алкильными цепями и агарозой не абсолютно прочные и может наблюдаться небольшое «подтекание» заместителей. Это не снижает характеристик колонок, однако между экспериментами их рекомендуется промывать 1 M NaCl и водой, а затем снова уравнивать рабочим буфером.

Фирма «Pharmacia» для целей гидрофобной хроматографии предлагает два варианта модифицированной «спитой» агарозы: «Octyl-Sepharose CL-4B» и «Phenyl-Sepharose CL-4B». Использование в качестве основы химически и термически стойкой сефарозы CL-4B позволяет присоединить к матрице указанные в наименованиях заместители прочными эфирными связями. Концентрация заместителей примерно вдвое выше, чем у продукции фирмы «Miles», соответственно увеличивается и емкость сорбента.

Названная продукция фирмы «Pharmacia» устойчива к действию таких денатурирующих агентов, как мочевины и гуанидинхлорид, к изменению pH в диапазоне 3—14 и к нагреванию до 120° при pH 7, что позволяет ее автоклавировать. При использовании детергентов следует иметь в виду, что они из-за своей гидрофобности сами сорбируются на модифицированной сефарозе, и перед повторным употреблением колонок их следует отмывать. Рекомендована следующая последовательность операций промывки колонок, заполненных октил- или фенилсефарозой CL-4B: промыть последовательно водой (один объем колонки), таким же объемом этанола, двумя объемами бутанола, затем в обратном порядке этанолом и водой. После этого колонку можно уравновесить исходным буфером для хроматографии. Скорость промывки 25—50 мл/см²·ч. Гидрофобные свойства фенилсефарозы выражены слабее, чем у октилсефарозы, поэтому первую, как правило, предпочитают для фракционирования более гидрофобных белков. Гидрофобные свойства фенилсефарозы выражены нем-

ногим сильнее, чем у бугилагарозы, однако во взаимодействии с белком могут участвовать и более специфические взаимодействия ароматических остатков (л—л-типа). Взаимодействия такого рода могут определить избирательную сорбцию белков, богатых ароматическими аминокислотами. Отметим, что недавно опубликованы данные о неоднородности гидрофобной функции продажной октилсефарозы CL-4B — о наличии в ней особо гидрофобных участков [Robillard et al., 1979].

Фирма «Serva» выпускает аналогичные сорбенты для гидрофобной хроматографии на основе силикагеля со средним диаметром пор 500 Å: «Octyl-SP 500», «Octadecyl-SP 500», «Phenyl-SP 500», «Aminohexyl-SP 500», «Aminopropyl-SP 500» и «Aminophenyl-SP 500».

Элюция снижающимся градиентом концентрации соли

Рассмотренный только что для обычной сефарозы, этот вариант элюции, естественно, находит применение и при использовании гидрофобизированной агарозы. В качестве примера процитируем недавно опубликованную работу по мягкой очистке HMG-белка из ядер печени на колонке ω-аминобутилагарозы. Этот белок растворим в растворе сульфата аммония вплоть до концентрации, достигающей 70% от насыщения. Сначала такой концентрацией СА в нейтральном 0,01 М трис-буфере высаливали из экстракта ядер большое количество балластного белка. Затем надосадочную жидкость, содержащую около 40 мг белка, вносили на колонку размером 2 × 30 см, уравновешенную тем же раствором СА. Элюцию вели снижающимся линейным градиентом концентрации СА в том же буфере (500 мл) со скоростью 20 мл/ч, т. е. примерно 7 мл/см²·ч. Низкая скорость элюции характерна для всех опытов такого рода ввиду повышенной вязкости концентрированных солевых растворов и соответствующего снижения скорости диффузии макромолекул. Около 30% белка не садилось на колонку и удалялось при первоначальной промывке. В ходе элюции выходило четыре пика, в первом из которых методом электрофореза идентифицировали HMG-белок [Conner, Comings, 1981].

Аналогичный прием был использован на заключительном этапе очистки топоизомеразы I из зародышей пшеницы. В этом случае в качестве сорбента была выбрана фенолсефароза, а элюцию вели линейным снижающимся градиентом СА (1—0,5 М) [Dyban et al., 1981]. Элюцию белков с гидрофобизированной агарозы можно вести снижающимся градиентом концентрации и других крепких солевых растворов. Например, очистку ДНК-синаптазы *E. coli* заканчивали хроматографией на фенолсефарозе с элюцией обратным линейным градиентом концентрации KCl (2 М—0) в слабом фосфатном буфере [Potter, Dressler, 1980].

Негистоновые белки хроматина (НБХ) из культуры клеток НТС (происходящих от гепатомы крысы) почти одинаково и полностью связываются с фенол- и октилсефарозой при концентрации NaCl от

1 до 4 М. В то же время доля связывания НБХ на гексилсефарозе для того же интервала концентраций соли практически линейно снижается от более чем 90% в 4 М NaCl до 50% в 1 М растворе. Это позволило осуществить фракционирование НБХ на колонке гексилсефарозы при ступенчатом снижении концентрации NaCl. Оказалось даже, что нет необходимости предварительно удалять ДНК и гистоны — при посадке хроматина на колонку в 4 М NaCl они не связываются с обменником и выходят в свободном объеме колонки [Shafer-Nielsen, Rose, 1982].

Элюция нарастающим градиентом концентрации соли

Ранее подчеркивалось, что смысл градиентной элюции при обратнoфазовой гидрофобной хроматографии заключается в постепенном увеличении растворимости задерживаемых на матрице белков в водном элюенте. В рассмотренных примерах такое увеличение осуществлялось за счет снятия высаливающего эффекта высокой концентрации соли. Но соль в умеренных концентрациях может способствовать растворению белка. Именно такой простейший механизм элюции был использован, например, в работе Хоппе и Вагнера по очистке цАМФ-зависимой протеинкиназы мышцы кролика на гексилсефарозе. Этот белок достаточно гидрофобен, для того чтобы из водного раствора надежно сорбироваться на сильно гидрофобной матрице. Сорбцию осуществляли в объеме, перемешивая растворенный в воде белок с гексилсефарозой в течение 15 мин. Затем ее промывали в воронке 0,009 М раствором NaCl в разбавленном нейтральном буфере и загружали в колонку, где промывали еще 0,02 М NaCl. Балластные гидрофильные белки уходили с промывкой, а гидрофобные, в том числе и очищаемый фермент, элюировали линейным градиентом NaCl (0,02—0,3 М) в том же буфере. Колонку регенерировали промывкой 3 М раствором гуанидинхлорида и водой. Гидрофобные матрицы авторы синтезировали сами путем присоединения различных алкиламинов к BrCN-активированной агарозе. В их распоряжении были сорбенты с различными алифатическими заместителями — от однодо семиуглеродного. Тонкость метода гидрофобной обратнoфазовой хроматографии иллюстрирует тот факт, что с пентилсефарозой протеинкиназа связывалась плохо, а с гептилсефарозы ее уже не удавалось снять [Hoppe, Wagner, 1977].

Использование хаотропных ионов Li^+

Некоторое недоумение на первый взгляд может вызвать другая работа, где гидрофобная обратнoфазовая хроматография использовалась, как и выше, для фракционирования негистоновых белков хроматина. В этой работе предварительно отделенные от нуклеиновых кислот и гистонов (на оксиапатите) белки хроматина сначала диализовали против довольно концентрированного раствора сульфата ам-

мония (40% от насыщения) в 0,01 М трис-буфере (pH 7,5), потом в этом же растворе смешивали с бутилагарозой или ω -аминобутилагарозой и загружали в колонку, где промывали тем же раствором. Эта часть эксперимента очевидна — из крепкого раствора СА белки высаливались и переходили на гидрофобную матрицу. Далее осуществлялась ступенчатая элюция — сначала просто 0,01 М трис-буфером; заметная доля белков при этом выходила из колонки, но далеко не все. Затем следовали три ступени элюции, где к буферу добавляли соль LiBr — сначала в концентрации 0,35 М, потом 1 М и, наконец, 5 М. И каждый раз с колонки элюировалась новая порция белка. Понять механизм такой элюции нетрудно, если вспомнить об упомянутом выше хаотропном эффекте ионов Li^+ . Ввиду важности понимания этого явления полезно подчеркнуть, что гидрофобное взаимодействие — это не сорбция и не взаимное притяжение липофильных молекул, а эффект «выталкивания» их из водной среды, энергетически выгодного, благодаря увеличению возможностей образования водородных связей в воде, т. е. ее структурирования. Этому структурированию и мешает присутствие высокой концентрации хаотропных агентов, в частности ионов Li^+ . В результате гидрофобное взаимодействие белка с матрицей ослабляется и он выходит в водный раствор. На заключительном этапе элюции использовали 1%-ный раствор ДДС-Na — это уже другой, хорошо известный способ солюбилизации гидрофобных веществ в воде с помощью детергентов [Comings et al., 1979].

Использование детергентов

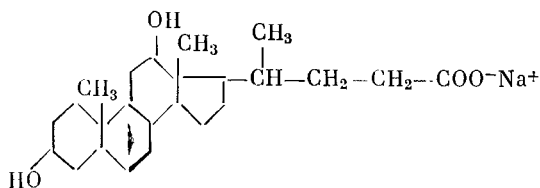
Элюция с использованием детергентов — пожалуй, наиболее распространенный способ хроматографического фракционирования белков на гидрофобно-модифицированных гелях агарозы. В обеспечении высокой избирательности хроматографического процесса, а тем самым — эффективной очистки нужного белка, важную роль играет выбор детергента с учетом особенностей его взаимодействия с очищаемым белком.

Следует напомнить структуру и свойства наиболее употребительных детергентов. Это — всегда довольно крупные молекулы, и в каждой из них можно обнаружить более или менее разнесенные пространственно липофильные и гидрофильные участки или химические группы. В так называемых «ионных» детергентах гидрофильную функцию выполняют заряженные группы (остатки кислот, аммониевая группа), в неионных — полиэтиленгликоль (ПЭГ) и остаток сорбитола. Липофильные участки представлены алифатическими цепями, фенильным остатком или полициклической структурой. Торговые наименования и структурные формулы наиболее часто используемых детергентов представлены ниже.

Отдельно показана формула ионного детергента дезоксихолата натрия с молекулярной массой 414; холат натрия отличается от дезоксихолата наличием еще одного гидроксила в связи с полициклической частью молекулы. Отметим также, что детергент Берол 172

Наименование	Структурная формула	Молекулярная масса. Дальтон
<i>Ионные детергенты</i>		
Додецилсульфат (лаурилсульфат) натрия	$\text{H}_{23}\text{C}_{12}-\text{O}-\text{SO}_3^- (\text{Na}^+)$	288
Саркозил (N-лаурилсаркозин)	$\text{H}_{23}\text{C}_{11}-\text{CO}-\overset{+}{\text{N}}\text{H}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	271
Цетавлон (цетилтриметиламмонийбромид)	$\text{H}_{33}\text{C}_{16}-\overset{+}{\text{N}}\text{H}(\text{CH}_3)_3 (\text{Br}^-)$	364
<i>Неионные детергенты</i>		
Тритон X-100	$(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{10}-\text{H}$	632
Твин 20	$\text{H}_{23}\text{C}_{11}-\text{COO}-\text{CH}_2[\text{CH}(\text{OH})]_4-\text{CH}_2\text{O}-$ $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{20}\text{H}$	1244
Бридж 35	$\text{H}_{25}\text{C}_{12}\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{23}\text{H}$	1198

сходен по структуре и свойствам с Тритоном X-100, а Луброл РХ — с Бриджем 35.



Дезоксихолат натрия

Из приведенных структурных формул видно, что избирательность взаимодействия детергента с гидрофобным участком на поверхности белка может быть обусловлена структурным соответствием этого участка (имеются в виду размеры, конфигурация, преобладание алифатических или ароматических остатков аминокислот) и гидрофобной части детергента.

В качестве иллюстрации такой избирательности можно процитировать работу [Nagasawa et al., 1979], авторы которой сопоставляли различные варианты очистки цитохром-с-оксидазы методом гидрофобной обратнофазовой хроматографии. Этот липофильный фермент выделяется в присутствии 1,5%-ного раствора холата натрия, который остается в растворе и при посадке белкового препарата на колонку. Из всех алифатически замещенных агарозных гелей цитохром-с-оксидаза наиболее прочно связывается с гексил- и октил-агарозой, хуже — с бутил- и децилагарозой. Здесь, по-видимому, и сказывается соответствие структур гидрофобных участков. Фенилсефароза, уступающая по гидрофобности даже бутилагарозе, тем не менее прекрасно сорбирует цитохром-с-оксидазу, что говорит о наличии в гидрофобном участке поверхности фермента остатков ароматических аминокислот. Понятно поэтому, что с фенилсефарозы

фермент легко снимается 3%-ными растворами детергентов, содержащих фенильную группу (Тритон X-100, Берол 172), но не снимается растворами «Tween-20» и ДОХ, а также цетавлоном и 1 М NaCl. В то же время с октилсефарозы «Tween-20» его снимает. Любопытно, что все перечисленные детергенты плохо элюируют фермент с ω -аминогексилсефарозы, зато он хорошо снимается 1 М раствором NaCl. Очевидно, что в этом случае решающую роль играет ионное взаимодействие фермента с аминогруппой модифицированной агарозы.

На рис. 89 показаны результаты эксперимента, в котором элюцию смеси белков, включающей и цитохром-с-оксидазу, с колонки фенилсефарозы вели последовательно пятью разными детергентами. Как и следовало ожидать, цитохром-с-оксидазу снимает Тритон X-100. Еще две зарегистрированные в опыте ферментативные активности выходят раньше, при элюции другими детергентами, а наибольшее количество сорбированного белка снимает с колонки на последнем этапе элюции ДДС-Na. Высокая эффективность ДДС-Na в качестве элюента, вероятно, связана с его относительно малой молекулярной массой. Можно предположить, что на каждый гидрофобный участок поверхности белка садится несколько молекул ДДС-Na, принося тем самым сильно выраженную гидрофильную функцию.

При очистке мембранных белков детергенты бывают необходимы и для экстракции белка из липидного окружения мембраны, и для поддержания его ферментативной активности в растворе (в какой-то мере имитируя это липидное окружение), и, наконец, в процессе самой гидрофобной хроматографии. Экспериментатору приходится гибко манипулировать последовательным выбором природы и концентрации различных детергентов для решения всех этих задач.

Так, при очистке так называемого «маннитол-специфичного фермента II» *E. coli* (входящего в состав системы фосфорилирования сахаров, переносимых через мембрану) для извлечения фермента из мембраны использовали 0,5%-ный раствор ДОХ. В его присутствии фермент «сажали» на колонку гексилгагарозы. При элюции в раствор ДОХ добавляли еще и Луброл PX до 0,5%. Этот детергент не только способствует элюции, но и необходим для проявления активности фермента, поэтому дальнейшую очистку — путем ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе — вели тоже в присутствии 0,5% Луброла PX [Jacobson et al., 1979]. Любопытно, что на заключительном этапе очистки авторы этой работы проводили хроматографию на аминогексилгагарозе, которая используется как ионообменник. Все в том же 0,5%-ном растворе Луброла PX фермент элюировали с колонки градиентом концентрации NaCl (0—0,3 М).

Прочитываем еще один недавний пример хроматографической очистки фермента из мембраны. Здесь используется только один детергент, но его функции в системе очистки варьируют в связи с изменениями его концентрации в растворе.

Фермент («coagulation factor III») экстрагировали из мозговой ткани 2%-ным раствором Тритона X-100 в 0,05 М Трис-буфере (pH 7,6), содержащим 0,1 М NaCl. Перед этим прочие, менее липофиль-

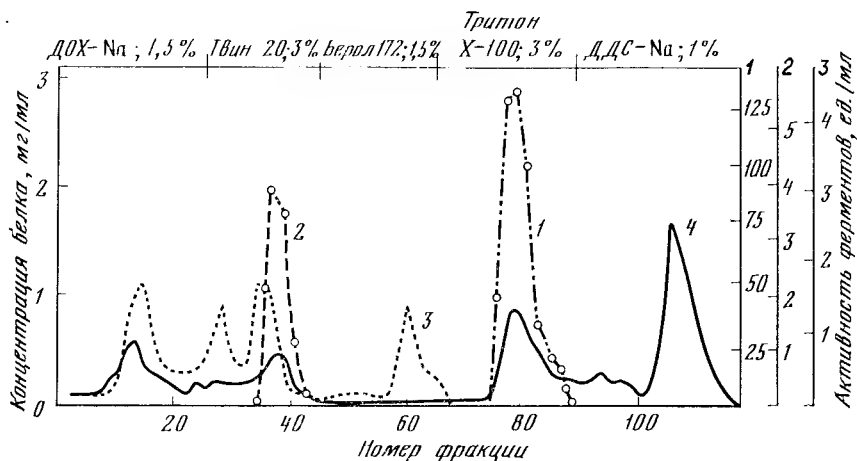


Рис. 89. Разделение некоторых ферментов из митохондрий печени крысы на колонке фенилсефарозы со ступенчатой элюцией сменой детергентов [Nagasawa et al., 1979]

1 — цитохром-с-оксидаза; 2 — НАДН- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -редуктаза; 3 — НАДН-NBT-редуктаза; 4 — концентрация белка

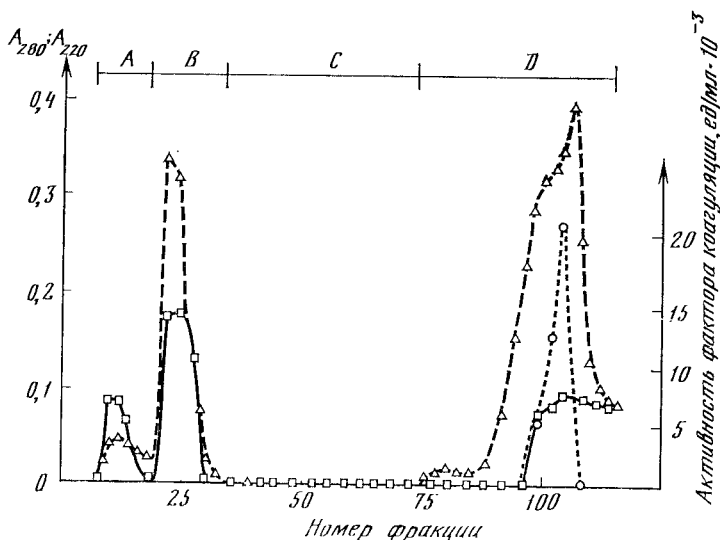


Рис. 90. Очистка фактора коагуляции из мозговой ткани на колонке фенилсефарозы (см. текст) [Carson, Konigsberg, 1981]

ные белки удаляли экстракцией 0,1%-ным раствором Тритона X-100. Фермент в комплексе с Тритоном X-100 сначала очищали флотацией в растворе сульфата аммония (между 30 и 70% насыщения), а затем снова растворяли в 0,1%-ном растворе детергента, содержащем и сульфат аммония (30% насыщения). Раствор вносили в колонку

фенилсефарозы ($2,5 \times 20$ см), которую промывали сначала буфером без Тритона X-100, но с той же концентрацией СА. На рис. 90, где представлен профиль элюции с колонки, первой промывке отвечает участок А. Следует обратить внимание на то, что выход белков регистрировали по УФ-поглощению пептидной связи A_{220} (пунктир). Сплошной линией отмечена оптическая плотность элюата при 280 нм, куда весьма заметный вклад дает поглощение детергента ($\lambda_{\max} = 275$ нм; 0,1 %-ный раствор Тритона X-100 имеет $A_{275} = 2,25$). На участке В происходила промывка колонки буфером без СА. Выход значительной порции балластных белков, очевидно, обусловлен снятием высаливающего эффекта СА. Поглощение при 280 нм здесь следует приписать самому белку, так как от свободного Тритона X-100 колонка была очищена при первой промывке. Далее на участке С на колонку подавали линейный градиент концентрации Тритона X-100 (0—1 %) в том же буфере. Любопытно, что при этом на выходе колонки Тритон X-100 не появлялся. Можно заключить, что на этом этапе элюции Тритон X-100 связывается с сорбентом и постепенно насыщает его гидрофобную функцию, что и делает возможной последующую элюцию. Исследования с помощью радиоактивно меченного Тритона X-100 показали, что 1 мл фенилсефарозы связывает 25 мг детергента. На заключительном этапе D элюцию вели 1 %-ным раствором Тритона X-100. Только теперь элюировались сильно гидрофобные белки, а в их числе — искомая ферментативная активность, отмеченная на рис. 90 линией точек [Carson, Konigsberg, 1981].

В работе Фабри и соавторов гидрофобная обратнофазовая хроматография была использована для очистки целых рибосом. Цилиндр от шприца на 2 мл заполняли октилсефарозой CL-4B и уравнивали буфером с малым содержанием соли (0,01 М Трис-HCl, pH 7,5 с 10 мМ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ и 60 мМ NH_4Cl). Около двух оптических единиц (A_{260}) препарата рибосом вносили в том же буфере на колонку и им же промывали. Элюировали рибосомы 1 %-ным раствором Бридж-35 — они выходили острым пиком. Задержание рибосом на октилсефарозе происходит за счет гидрофобных взаимодействий матрицы с липофильными участками некоторых рибосомальных белков. Интересно, что рибосомы, сорбированные на миллипоровом фильтре, тоже легко снимаются 1 %-ным раствором Бридж-35. Это проясняет давно используемый, но не раскрытый механизм сорбции рибосом на нитроцеллюлозных фильтрах [Fabry et al., 1981].

Использование этиленгликоля

Диэлектрическая проницаемость этиленгликоля (ЭГ) примерно вдвое меньше, чем у воды, поэтому его достаточно концентрированные водные растворы отличаются заметно сниженной полярностью. В них ослабевают силы гидрофобного взаимодействия, что обеспечивает элюцию с гидрофобизированной агарозы не слишком липофильных веществ.

В качестве наглядного примера рассмотрим трехступенчатую очистку одного из ферментов фосфотрансферазной системы *E. coli*

методом обратнoфазoвoй гидрофoбнoй хроматографии. К супернатанту после центрифугирования (48 000 g) экстракта из 60 г бактериальных клеток добавляли ЭГ до 30% и вносили эту смесь на колонку октилсефарозы (5 × 25 см), уравновешенную 30%-ным раствором ЭГ в 5 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем по 1 мМ ЭДТА, ДТТ и NaN₃. Элюцию вели линейным градиентом концентрации ЭГ (30—60%) в том же буфере. Пик фермента выходил при концентрации ЭГ около 47%. Собранные фракции разбавляли до 40%-ного содержания ЭГ, а затем концентрацию Na-фосфата увеличивали до 35 мМ и вносили весь этот материал на вторую колонку октилсефарозы (5 × 15 см), уравновешенную тем же буфером. На этот раз элюцию вели другим градиентом ЭГ (40—80%). Фермент выходил при концентрации ЭГ около 67%. Обратим внимание на то, что ион фосфата способствует усилению гидрофобного взаимодействия вещества с матрицей; эта его особенность нам уже встречалась. Ферментативно активные фракции со второй колонки октилсефарозы разбавляли до 10%-ной концентрации ЭГ и одновременно снова уменьшали концентрацию фосфата до 5 мМ. Из такого раствора препарат „сажали“ на колонку фенолсефарозы, уравновешенную тем же раствором. Элюцию вели линейным градиентом ЭГ (10—50%). Хорошо очищенный фермент выходил при 30%-ной концентрации ЭГ. Последний можно было затем удалить гель-фильтрацией на сефадексе G-25 [Robillard et al., 1979].

Авторы данной работы обратили внимание на то, что в продажной октилсефарозе CL-4B фирмы «Pharmacia» имеются какие-то особо гидрофобные примеси. Часть исследуемого ими фермента сорбировалась на колонке так прочно, что ЭГ ее не снимал. Для элюции этой доли фермента нужно было использовать 1%-ный раствор холата натрия. Столь прочное задержание части фермента было связано именно с особенностями матрицы, поскольку при внесении на новую порцию сефарозы препарата, ранее снятого с колонки этиленгликолем, часть его снова так же прочно сорбировалась на матрице. Можно предположить, что при модификации сефарозы в октиловом спирте присутствовали более высокомолекулярные примеси.

Авторы рекомендуют предварительно насытить эту гипергидрофобную функцию матрицы, внося на нее бактериальный экстракт в присутствии 30% ЭГ и элюируя его затем 90%-ным раствором ЭГ.

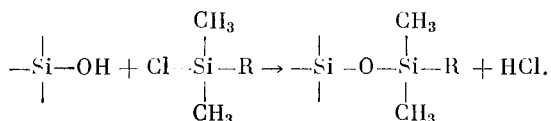
ОБРАТНОФАЗОВАЯ ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ (ЖХВД)

ВВОДНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Давление, под которым элюент подается на колонку, при ЖХВД обычно превышает 100 атм, а иногда достигает и 400. Его создают специальные плунжерные насосы, конструкция которых была описана в гл. 3. Необходимость в столь высоком давлении, как указы-

валось, обусловлена использованием сорбентов с размером гранул 5—10 мкм и высоких скоростей элюции (300—700 мл/см²·ч). Такие сорбенты должны отличаться жесткостью, поэтому они изготавливаются на основе силикагеля — либо сплошь пористого, с размером пор 60—100 Å, либо покрывающего тонкой пористой пленкой стеклянные сферические гранулы диаметром 30—40 мкм (см. гл. 2). Поверхность силикагеля модифицируется химической присадкой веществ, обладающих необходимыми для хроматографии свойствами, в данном случае — гидрофобностью.

Как правило, химическая связь модификатора с силикагелем является силоксановой: моноклорсилановое производное алифатической или ароматической молекулы реагирует с силанольной группой на поверхности силикагеля, образуя прочную эфирную связь:



В качестве гидрофобного радикала R в большинстве случаев фигурируют этил (C₂), октил (C₈), октадецил (C₁₈) или фенил. Условные обозначения характера модификации силикагелевых матриц приведены в гл. 2. Модификацию можно осуществить с помощью ди- или трихлорсилановых производных соответствующего радикала, но наиболее полную модификацию поверхности дает использование моноклорсилановых производных.

Следует иметь в виду, что из-за стерических препятствий в реакцию с модификатором вступает лишь около 40% силанольных групп на поверхности матрицы; удается достичь поверхностной плотности расположения модифицирующих радикалов, равной 2,9—3,4 мкмоль/м², в то время как исходная плотность силанолов составляет 8—9 мкмоль/м².

По незамещенным силанолам может происходить неконтролируемая сорбция белков или малых молекул, например ионов при так называемой «ион-парной» хроматографии (см. ниже), от чего страдают разрешающая способность и воспроизводимость хроматографического процесса. Во избежание этого силикагель после модификации обрабатывают еще и низкомолекулярным модификатором гидрофобной природы — триметилхлорсиланом. О том, какой эффект дает такая дополнительная обработка, можно судить по следующему примеру. Для фенилтиогидантоинового производного аргинина (ФТГ-Arg) на колонке «Ultrasphere ODS», не обработанной триметилхлорсиланом, при элюции 50%-ным метанолом значение K_d составляет 4,33. После такой обработки задержание ФТГ-Arg на колонке уменьшается настолько, что ему отвечает значение $K_d = 1,67$. Между тем для ФТГ-Val подобного эффекта не наблюдается. Очевидно, что положительно заряженный остаток аргинина взаимодействует с отрицательным зарядом ионизированной силанольной группы. Из этого примера ясно, что экспериментатору следует знать, был ли имеющийся в его распоряжении сорбент дополнительно об-

работан с целью блокировки свободных силанолов. Вообще следует иметь в виду, что хроматографические характеристики одинаково (по наименованию) модифицированных силикагелей, поставляемых различными фирмами, нередко отличаются друг от друга из-за различий структуры исходных силикагелей. Желательно, чтобы поры силикагеля были одинаковыми по размерам и достаточно крупными. В микропорах могут оставаться незаблокированные силанолы, доступные для малых молекул элюента.

Ионизированные группы в составе хроматографируемого вещества, например на поверхности белка, хорошо гидратируются, что препятствует гидрофобному взаимодействию с сорбентом. Ионизацию стараются подавить соответствующим выбором рН элюента. Однако следует помнить, что сам силикагель устойчив только в интервале рН 2—7,5; при щелочных значениях рН он постепенно растворяется водой. Поэтому при наличии в веществе кислых ионогенных групп в состав элюента вводят нейтрализующие их контрионы. Нередко в качестве таковых выбирают относительно крупные малоподвижные заряженные группы. В процессе хроматографии они остаются в непосредственной близости к ионогенным группам вещества, образуя с ними ионные пары. Выбор химической природы тяжелых контрионов позволяет управлять силой гидрофобного взаимодействия вещества с сорбентом. Если контрионы несут в своей структуре гидрофобные функции, то они могут усиливать это взаимодействие, если же контрионы гидрофильны, то с их помощью гидрофобное взаимодействие вещества с сорбентом можно контролируемым (иногда избирательным) образом ослабить. Хроматографию, использующую этот прием, называют иногда «ион-парной гидрофобной хроматографией», а чаще — просто «ион-парной хроматографией». Хотя в последнем наименовании гидрофобность выпала, следует помнить, что оно обозначает лишь определенную модификацию основного процесса обратнотазовой гидрофобной хроматографии.

Сорбенты с дополнительной маркировкой «IP» или «Ion Pair» выпускаются специально для ион-парной хроматографии. Они представляют собой обычным образом модифицированные гидрофобные силикагели, но с особенно тщательной блокировкой немодифицированных силанольных групп. Отдельную главу открывает возможность введения в элюент ионов металлов, способных образовывать хелатные комплексы с некоторыми компонентами фракционируемой смеси веществ.

Элюцию при обратнотазовой гидрофобной ЖХВД осуществляют за счет присутствия или градиентного увеличения содержания в водном элюенте (слабом буфере) добавок тех или иных органических растворителей. Они должны быть невязкими (во избежание чрезмерного роста гидравлического сопротивления колонки) и по возможности прозрачными в области УФ-поглощения компонентов белков и НК. Параметры нескольких, наиболее подходящих с этой точки зрения органических растворителей для ЖХВД представлены ниже [Brown, Krstulovic, 1979]:

Растворитель	Мол. масса, Дальтон	$t_{\text{кип}}$, °C	Коэффи- циент прелом- ления	УФ-гра- ница ($\lambda=1$), нм	ρ_{20} , г/см ³	η , сП	Дизл. постоян- ная
Ацетон	58	56	1,357	330	0,791	0,32	20,7
Ацетонитрил	41	82	1,342	190	0,787	0,36	38,8
Диоксан	88	101	1,420	215	1,034	1,26	2,2
Метанол	32	65	1,326	205	0,792	0,58	32,7
Этанол	46	78	1,359	205	0,789	1,19	24,5
Пропанол	60	97	1,383	205	0,804	2,20	20,3
Изопропанол	60	82	1,375	205	0,785	2,39	19,9
ТГФ	72	66	1,404	210	0,889	0,51	7,6
Вода	18	100	1,333	170	0,998	1,00	78,5

Из этих данных видно, что совокупности двух упомянутых требований лучше всего отвечают ацетонитрил и метанол. Ацетонитрил особенно популярен в ЖХВД, так как имеет не только меньшую вязкость, но и более низкую, чем у метанола, упругость паров, что уменьшает опасность кавитации в насосах при быстром всасывании в них элюента. С другой стороны, хорошо очищенный ацетонитрил для ЖХВД дорог, а очистка его в лабораторных условиях затруднительна.

Вообще проблема чистоты растворителей из-за очень высокой чувствительности методов ЖХВД является, пожалуй, наиболее трудной. Даже адекватная очистка воды оказывается очень нелегким делом. Высокочувствительная регистрация поглощения хроматографируемых веществ в диапазоне 205—210 нм требует очистки воды от малейших органических примесей. Этого не удастся добиться перегонкой и деионизацией. Фирма «Barnstead» (США), например, поставляет воду, специально очищенную для ЖХВД методом фотоокисления (торговое название — «organic pure water»). У такой воды $A_{210} \leq 0,5 \cdot 10^{-3}$, однако даже столь низкое значение соизмеримо с пределами чувствительности современных денситометров, которая, как указывалось в гл. 3, достигает 0,001 оптической единицы на всю шкалу регистрации (мы вовсе не утверждаем, что без такой особо чистой воды нельзя обойтись; все зависит от того, какова требуемая чувствительность метода и на какой длине волны предстоит вести детектирование).

Органические растворители также должны быть хорошо очищены и храниться в условиях, исключающих их окисление или разложение под действием света. Такую же чистоту должны иметь и вводимые в состав элюента соли и буферные смеси, хотя здесь ситуация несколько облегчается ввиду их обычно невысокой концентрации. Заметим, что следует избегать соединений, содержащих галогены, ввиду их высокой химической активности по отношению к стали, из которой изготавливают колонки, насосы и трубопроводы. К этой проблеме в ее биохимическом аспекте мы вернемся в гл. 7, посвященной ионообменной хроматографии.

Из-за относительно малого размера пор большинства продажных модифицированных силикагелей традиционной областью приложения обратнофазовой гидрофобной ЖХВД для интересующих нас объектов было фракционирование и очистка сравнительно низкомолекулярных компонентов белков и НК: аминокислот, пептидов, нуклеозидов и коротких олигонуклеотидов. Мы начнем с анализа опыта, накопленного в этой области, чтобы далее обратиться к рассмотрению возможности использования такого типа ЖХВД для исследования самих белков и нуклеиновых кислот. Но сначала сделаем несколько практических замечаний общего характера, относящихся к планированию и подготовке хроматографического эксперимента.

ПОДГОТОВКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Выбор матрицы и элюента

Этот выбор определяется степенью гидрофобности фракционируемых веществ. Поскольку предварительно оценить ее количественным образом невозможно, приходится идти по пути эмпирического подбора оптимальных условий хроматографии. При этом можно исходить из того, что такому оптимуму отвечает обычно значение коэффициента распределения вещества между фазами в интервале 8—10. Экспериментально такому значению K , как нам известно из гл. 1, соответствует примерно такое же отношение объемов элюции веществ к свободному объему колонки V_R/V_0 (или соотношение времен задержания). Будем иметь в виду, что гидрофобность матриц убывает в следующем ряду типов: RP-18, RP-8, RP-2, а гидрофобность органических растворителей — в ряду ТГФ — ацетонитрил — пропанол — метанол. Можно рекомендовать следующую последовательность операций при подборе условий эксперимента:

1. На сорбенте типа RP-8 попробовать осуществить изократическую элюцию чистыми органическими растворителями в порядке убывания их гидрофобности. Выбрать тот из них, в котором интересующие компоненты смеси веществ выходят при значениях V_R , немного больших V_0 .

2. Опробовать различные пропорции смеси этого растворителя с водой и выбрать из них оптимальную (для изократической элюции), когда $V_R/V_0 = 8 \div 10$.

3. Если при этом компоненты смеси плохо разделяются, то провести такой же подбор элюента для сорбента типа RP-18.

4. Если же эти компоненты слишком сильно расходятся между собой (а наиболее гидрофобные из них элюируются с трудом), попробовать сорбент типа RP-2 или перейти на градиентную элюцию, когда процентное содержание органического растворителя в элюенте будет возрастать от минимального, при котором хорошо элюируется наименее гидрофобный компонент смеси, до максимального значения, отвечающего оптимальным условиям элюции наиболее гидрофобного компонента.

5. Более тонкую оптимизацию условий хроматографии в целях улучшения характера разделения пиков и их формы можно осуществить путем подбора крутизны градиента (его объема), длины колонки и скорости элюции в соответствии с общими рекомендациями, вытекающими из теории хроматографического процесса (см. гл. 1).

6. Если некоторые компоненты смеси веществ, представляющие интерес, несут электрический заряд и поэтому плохо задерживаются сорбентом (т. е. гидрофильны), то постараться подавить этот заряд выбором рН буфера (в кислой области) или использовать ион-парную хроматографию, ориентируясь на один из приведенных ниже примеров.

Подготовка препарата

Необходимо проверить его полную растворимость в смеси органических растворителей с водой или буфером для всех пропорций этой смеси, образующих градиент элюции. Исходный раствор препарата следует отфильтровать через фильтр с отверстиями размером не более 0,5 мкм. Препарат должен быть по возможности растворен в исходном элюенте, которым уравновешена колонка, поэтому на предшествующих этапах очистки препарата желательно использовать летучие буферы и удалять их лиофилизацией. Если в препарате содержатся нелетучие соли, их следует убрать диализом или гель-фильтрацией. Можно использовать предколонку для защиты основной колонки.

Подготовка элюента

Помимо использования максимально чистых его компонентов, о чем достаточно сказано выше, элюент необходимо деаэрировать. Эту операцию следует проводить отдельно для воды и органических растворителей, а затем уже смешать их в выбранной пропорции. В противном случае эта пропорция может изменяться в ходе деаэрирования, если компоненты смеси «летят» по-разному. Готовый элюент следует отфильтровать, как указано выше. Для биохимических препаратов в качестве органических растворителей практически используют только ацетонитрил, пропанол и метанол. Не следует забывать, что ацетонитрил очень ядовит.

Хранение колонки

Колонки для ЖХВД используются многократно, нередко сотни раз в течение целого года, но в то же время стоят дорого, поэтому хранению их в промежутке между опытами должно быть уделено большое внимание. Колонки для обратнотазной гидрофобной ЖХВД предпочтительно хранить уравновешенными чистым органическим растворителем или хотя бы сильно обогащенной (80%) его смесью с водой. Перед использованием их следует сначала промывать органическим растворителем, а затем уже уравнивать элюентом

начального состава, пропуская его в количестве не менее 10 свободных объемов колонки. В случае засорения входного защитного фильтра колонки (см. гл. 3), что обнаруживается по росту давления, необходимого для поддержания определенной скорости элюции, этот фильтр можно снять и очистить обработкой ультразвуком в метаноле или ацетоне.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Хроматографию немодифицированных аминокислот, которые плохо растворяются в воде, можно иногда вести на гидрофобизированном силикагеле без добавления в элюент органических растворителей. Так, Ханкок и соавторы фракционировали аминокислоты на колонке « μ Bondapak-alkylphenyl» размером $0,4 \times 30$ см простой изократической элюцией 0,1%-ным водным раствором фосфорной кислоты. Закисление элюента до pH 2,5 обеспечивало нейтрализацию карбоксиллов аминокислот. Все аминогруппы при таком pH заряжены положительно, но их заряды в значительной мере блокируются анионами фосфата, что сообщает аминокислотам весьма умеренную гидрофильность, отвечающую условиям обратнотазовой гидрофобной хроматографии. Суммарное количество аминокислот в исходной смеси варьировали от 10^{-4} до 10 мкг в объеме от 1 до 50 мкл. Использовали аппаратуру для ЖХВД фирмы «Waters». Элюцию вели со скоростью 1,5 мл/мин (~ 700 мл/см²·ч) при комнатной температуре под давлением 133 атм. На выходе колонки пики отдельных аминокислот регистрировали по УФ-поглощению при 200 нм, используя диапазоны чувствительности 0,002 и 0,02 оптической единицы на шкалу. Все растворы были отфильтрованы через миллиметровые фильтры (0,45 мкм) и деаэрированы. Ароматические аминокислоты разделялись хорошо, но пары аминокислот Gly и Ala, Ser и Thr, Leu и Ile разделить не удалось. Лучшие результаты были получены при добавлении в элюент неизменной концентрации метанола. Для разделения указанных пар аминокислот авторы использовали другую, более гидрофобную матрицу « μ Bondapak-C₁₈». При этом в элюент, кроме 0,01% фосфорной кислоты (pH 2,7), пришлось добавить фосфат натрия (0,01 М), 2-метилбутан-2-ол (0,5%) и ДДС-Na (5 мМ), т. е. воспользоваться вариантом элюции с помощью детергента [Hancock et al., 1979].

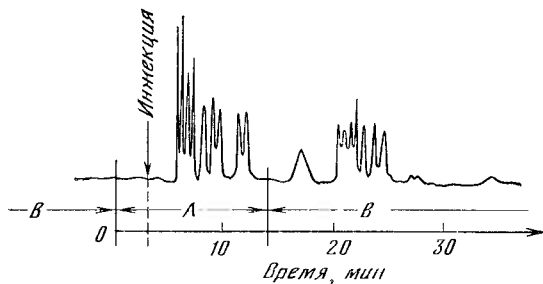
В другом варианте обратнотазовой гидрофобной хроматографии плазмы крови на колонке «LiChrosorb RP-8» элюцию вели в среде, подкисленной до pH 3 монохлоруксусной кислотой, используя выпуклый градиент концентрации ацетонитрила (0—45%) в смеси с 0,05 М раствором ДДС-Na (1,4%). Последний, по-видимому, блокирует заряды аминогрупп и обеспечивает гидрофобность аминокислот, т. е. играет роль ион-парного агента, как подробнее описано ниже для случая фракционирования пептидов.

Введение флюоресцентной метки аминокислот ортофталевым альдегидом (ОФА) не только обеспечивает возможность очень чувствительного детектирования аминокислот, но и вносит дополнитель-

ную гидрофобность, облегчающую их фракционирование. В присутствии β-меркаптоэтанола ОФА реагирует с первичным аминокислоты, образуя флюоресцирующее производное. Максимум его возбуждения лежит при 340 нм, максимум флюоресценции — при 445 нм; сам же ОФА не флюоресцирует [Остерман, 1981].

Так, Гарднер и Миллер разделяли смесь всех 20 аминокислот (по 25 пмоль каждой) на колонке «MicroPak MCH-5» фирмы «Varian» (модификатор — октадецил, диаметр гранул 5 мкм) размером 0,4·

Рис. 91. Разделение меченых ОФА аминокислот на колонке «MicroPak MCH-5» (см. текст) [Gardner, Miller, 1980]



·30 см. 50 мг ОФА растворяли в 1 мл этанола, добавляли 50 мкл β-меркаптоэтанола, затем смешивали с 90 мл воды, куда было добавлено 3 г борной кислоты и КОН до pH 10,5. Объем смеси доводили до 100 мл водой и добавляли 0,3 мл 30%-ного раствора Бридж-35, что увеличивает флюоресценцию лизина. Полученный таким образом реактив за 3—4 мин до впрыскивания в колонку смешивали с раствором аминокислот.

Ступенчатую элюцию со скоростью 1 мл/мин вели с помощью двух растворов: А — метанол с водой в соотношении 17 : 192 и В — метанол и 0,05 М KH_2PO_4 , pH 4,5 (3 : 2). Колонку предварительно уравнивали раствором В. За 3 мин 10 с до инъекции аминокислот на нее начали подавать раствор А и продолжали элюцию им в течение еще 10 мин 50 с (это улучшает разрешение рано выходящих пиков). Остальное время (еще 26 мин) элюцию снова вели раствором В. На рис. 91 показана картина расположения пиков аминокислот на выходе из колонки, зарегистрированная флуориметром с проточной кюветой («Aminco Fluoromonitor»). Пролин и дистеин здесь отсутствуют, так как с первым из них ОФА не дает флюоресцирующего производного (ведь пролин — вторичный амин), а со вторым реагирует очень слабо [Gardner, Miller, 1980]. Современные аминокислотные анализаторы дают лучшее разрешение, но за более длительное время; в них используется метод ионообменной хроматографии, с которым мы познакомимся ниже.

Реакция присоединения данзилхлорида по первичным аминогруппам давно используется для флюоресцентной метки пептидов и аминокислот [Остерман, 1981]. Как и в случае ОФА, при этом одновременно существенно увеличивается степень гидрофобности аминокислот, что улучшает возможности их хроматографии и повышается чувствительность детектирования. Существенным недостатком ме-

тогда до последнего времени считался неодинаковый выход данзиллированных производных разных аминокислот при обработке их смеси, зависящий от соотношения концентраций данзилхлорида и каждой из аминокислот. Причина этого, в частности, состоит в том, что при избытке данзилхлорида протекает реакция отщепления аминогруппы от аминокислоты с образованием данзиламида. Такое положение служило препятствием для количественного аминокислотного анализа.

Авторы недавно опубликованной работы сообщают, что в найденных ими условиях данзилирования высокий выход реакции (90—100%) одинаков для всех аминокислот и не зависит от соотношения концентраций вплоть до 1000-кратного избытка данзилхлорида [Tarihi et al., 1981].

Аминокислоты в концентрации от 1 мкМ до 1 мМ они рекомендуют растворять в 0,04 М Li_2CO_3 , титрованном НСl до pH 9,5, а данзилхлорид — в ацетонитриле (1,5 мг/мл). 1 мл раствора данзилхлорида быстро добавляли к 2 мл раствора аминокислот, осторожно встряхивали 2 мин, а затем оставляли при комнатной температуре на 35 мин. Для окончания реакции к смеси добавляли 0,1 мл 2%-ного раствора этил- или метиламингидрохлорида. Реакционные сосуды для защиты от света обертывали в фольгу. Фракционирование проводили на колонках силикагеля, модифицированного октилом («C.-Supelcosil», диаметр гранул 5 мкм), размером $0,46 \times 15$ см со скоростью 2 мл/мин. Для изократической элюции использовали смесь метанола и воды (42 : 58) с добавлением ледяной уксусной кислоты (до 0,6%) и триэтиламина (до 0,008%). Детектирование вели с помощью простого флуориметра ($\lambda_{\text{возб}} = 250$ нм; $\lambda_{\text{флюор}} = 470$ нм). Метод позволяет регистрировать до 1 пмоль аминокислоты.

В работе [De Jong et al., 1982] была сопоставлена чувствительность аминокислотного анализа обратнофазовой гидрофобной хроматографией в случае предварительного данзилирования аминокислот по только что описанному методу с чувствительностью современных аминокислотных анализаторов, использующих ионообменную хроматографию. Испробовав различные сорбенты для ХОФ, авторы остановились на колонке «Aquapore RP-300» фирмы «Brownlee Labs». Элюцию при 55° вели нарастающим линейным градиентом (0—35%) изопропанола с одновременным линейным снижением концентрации метилэтилкетона (10—3%). Для малых исходных количеств препарата (гидролизат 100—300 пмоль пептида) они отдают предпочтение обратнофазовой хроматографии.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФТГ-ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Большое число работ, опубликованных в 1980—1983 гг., посвящено отработке обратнофазовой гидрофобной хроматографии фенилтиогидантоиновых производных аминокислот (ФТГ-АК). В виде таких производных аминокислоты одна за другой отщепляются при автоматическом определении последовательности аминокислот в полипептиде по методу Эдмана. Эта операция получила название «секвенирования» белков, а соответствующие автоматические приборы

называют «секвенаторами». Само секвенирование не имеет прямого отношения к хроматографии, поскольку оно представляет собой способ автоматизации проведения определенной химической реакции, и не более того. Однако продукты этой реакции идентифицируются исключительно методами хроматографии, а само секвенирование белков играет столь важную роль в молекулярной биологии, что необходимо хотя бы в общих чертах познакомить читателя с методом Эдмана и принципом устройства секвенаторов; это ознакомление вынесено в конец книги — см. прил. 1.

Как правило, для фракционирования ФТГ-АК исследователи останавливают свой выбор на колонках силикагеля, модифицированного октадецилом, однако системы элюции варьируют довольно значительно. Для иллюстрации достигнутого уровня процитируем несколько недавних работ и кратко упомянем различные подходы, описанные в ряде публикаций последних лет.

Процедура, предложенная Фольман и соавторами, привлекает доступностью и нетоксичностью элюента — раствора спектрально чистого этанола в 0,1 М ацетате аммония (рН 5,1). Правда, форма градиента получается довольно сложной (рис. 92). Авторы использовали хроматограф фирмы «Waters» с программным устройством (модель 660). На колонку « μ -Bondapak- C_{18} » (0,39 $\times$ 30 см) для элюции смеси 29 ФТГ-АК сначала подавали в течение 10 мин вогнутый градиент этанола (13—34%), затем в течение 15 мин вели элюцию постоянной концентрацией этанола (34%) и, наконец, ступенью снижали эту концентрацию до 13%. Скорость элюции 1,1 мл/мин (550 мл/см²·ч). Колонка была термостатирована при $37 \pm 0,2^\circ$; давление — примерно 70 атм. Указанные значения скорости элюции, температуры, рН и ионной силы должны выдерживаться строго. Так, при увеличении скорости не разделяются ФТГ-производные Phe и Ile. При рН < 5,1 задерживаются кислые аминокислоты, а при больших рН не разделяются ФТГ-карбоксиметилцистеин (цистеин, как обычно, во избежание окисления алкилировали) и ФТГ-Gly. При изменении концентрации ацетата аммония сдвигаются пики ФТГ-Arg и ФТГ-His. Разделение ФТГ-АК, показанное на рис. 87, можно считать достаточно хорошим. Авторы утверждают, что оно отлично воспроизводится [Fohlman et al., 1980].

Элюцию градиентом концентрации этанола в 0,033 М растворе ацетата натрия (рН 5,1) для аналогичных целей применяла и другая группа авторов [Sottrup-Jensen et al., 1980]. Они работали с колонками, заполненными «Spherisorb 5S-ODS», используя комбинацию двух линейных градиентов концентрации этанола при скорости 2 мл/мин и температуре 62°. Повышение температуры авторы обосновывают относительно высокой вязкостью этанола.

В другой работе [Bhown et al., 1981] для идентификации ФТГ-АК методом гидрофобной хроматографии на колонке «Ultrasphere ODS» использована двухступенчатая элюция метанолом в смеси с 0,04 М раствором ацетата натрия (рН 3,72): сначала неизменной концентрацией (23%) метанола, а затем линейным градиентом его концентрации (23—53%). За 16 мин хорошо разделились все ФТГ-АК, за ис-

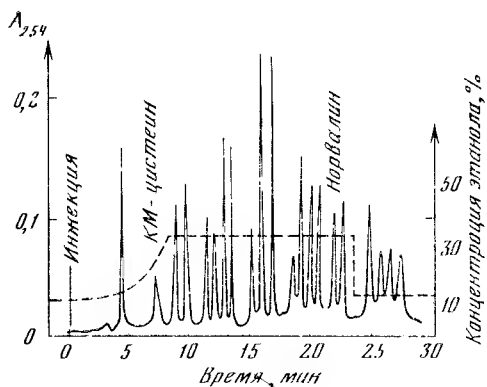


Рис. 92. Фракционирование ФТГ-аминокислот на колонке «*Bondapak-C₁₈*» сложным градиентом концентрации этанола [Fohlman et al., 1980]

Сплошная линия — оптическая плотность, пунктир — концентрация этанола

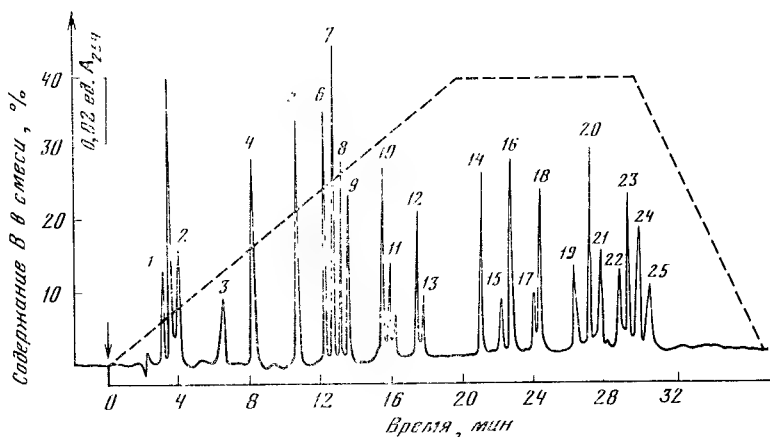


Рис. 93. Разделение ФТГ-аминокислот на колонке «*Ultrasphere-ODS*» (см. текст) Somack, 1980]

1 — Cys-O₃H; 2 — Asp; 3 — CM-Cys; 4 — Glu; 5 — Asn; 6 — Ser; 7 — Gln; 8 — Thr; 9 — Gly; 10 — His; 11 — Met-SO₂; 12 — Ala; 13 — OH-Pro; 14 — Tyr; 15 — SM-Cys; 16 — Pro; 17 — Met; 18 — Val; 19 — Arg; 20 — Trp; 21 — Phe; 22 — Ile; 23 — CM-Lys; 24 — Leu; 25 — N-Leu; сплошная линия — A_{254} ; пунктир — содержание раствора В, %

ключением производных Ile и Lys. Их несложно идентифицировать методом ТСХ.

На такой же колонке размером 0,46 × 15 см удалось достаточно хорошо разделить все ФТГ-АК в иной системе органических растворителей: А — 5%-ный раствор тетрагидрофурана (ТГФ) в 4,2 мМ CH₃COOH, титрованный NaOH до pH 5,16; В — 10%-ный раствор ТГФ в ацетонитриле. Скорость элюции составляла 1,3 мл/мин, колонку термостатировали при 45°. Форма градиента и профиль элюции ФТГ-АК представлены на рис. 93. Как и в предыдущем случае, многие пики выходят довольно тесными группами. Это означает, что небольшое изменение времени задержания на колонке может привес-

ти к ошибке в идентификации ФТГ-АК. Между тем это время существенно зависит от температуры, скорости элюции, рН и ионной силы раствора. Последние два параметра особенно сильно влияют на элюцию основных и кислых аминокислот (Arg, His, Glu и Asp). По-видимому, для них немаловажную роль играет ионное взаимодействие с остаточными силанольными группами силикагеля. Все это накладывает жесткие ограничения на допустимые отклонения от выбранного режима [Somack, 1980]. Понятно, что в ответственных случаях идентификацию ФТГ-АК стремятся подкрепить вторым независимым методом, например ТСХ.

Был предложен вариант хроматографии на двух последовательно соединенных колонках одного типа (C_{18}) и размера ($0,46 \times 25$ см), но с несколько различающимися характеристиками — по-разному разделяющих различные ФТГ-АК, например «Zorbax ODS» и «Hibar RP-18». В этом случае удалось осуществить изократическую элюцию смесью ацетонитрила (32%) и 0,035 М раствора CH_3COONa , рН 4,32 (68%) при температуре 52° и скорости элюции 2 мл/мин [Rose, Schwartz, 1980].

Описан вариант «квазиизократической» элюции на колонке «Zorbax ODS» ($0,46 \times 25$ см). Сначала ее уравнивали 22,5%-ным раствором ацетонитрила в 0,01 М CH_3COONa (рН 5,4), а в момент впрыскивания смеси ФТГ-АК насос переключали на подачу 46,5%-ного раствора ацетонитрила в том же буфере. Температура элюции 60° , скорость 0,9 мл/мин [Zalut, Harris, 1980].

Тарр недавно описал изократическое фракционирование ФТГ-АК на колонке «Ultrasphere ODS» ($0,46 \times 25$ см) 48%-ным раствором CH_3CN в 0,065 М ацетате аммония (рН 4,54) при температуре 55° в режиме изменения скорости элюции в ходе фракционирования от 1 до 2 мл/мин. Разделение пиков оставляет желать лучшего, но зато весь анализ занимает 6—9 мин [Tarr, 1981].

Закончим перечень примеров двумя работами 1982 г. Блэк и Конн разделяли ФТГ-АК на такой же колонке («Ultrasphere ODS»), что и Тарр, при температуре 60° и скорости 1 мл/мин двумя ступенями изократической элюции: 1 — смесь буфера, содержащего 0,04 М CH_3COONH_4 и 0,01 М триэтиламинийацетата (рН 4,5), с ацетонитрилом в пропорции 3 : 1 (0,8 мин); 2 — смесь 0,05 М CH_3COONH_4 и ацетонитрила в пропорции 1 : 1 (11,2 мин). Регистрацию вели по УФ-поглощению при 254 нм. Максимум поглощения ФТГ-АК лежит при 269 нм, но и при 254 нм поглощения еще вполне достаточно для надежной регистрации пиков на шкале 0,05 оптической единицы. В работе имеется весьма полезная таблица молярных экстинкций при $\lambda = 254$ нм для всех ФТГ-АК как в абсолютных значениях, так и по отношению к норлейцину [Black, Coop, 1982].

Хоук и соавторы отдали предпочтение ион-парной хроматографии ФТГ-АК на колонке «Ultrasphere ODS» с использованием трифторуксусной кислоты (ТФУ) в качестве гидрофобного контриона. Для элюции при температуре 48° приготавливали следующие растворы: А — смесь 33 мМ ТФУ и 2 мМ CH_3COOH титровали 1 М $NaOH$ до рН 5,6 и смешивали с ацетонитрилом в пропорции 9 : 1; В — 35 мМ

раствор ТФУ, титрованный до pH 3,6 и смешанный с ацетонитрилом в пропорции 1 : 3. Форма градиента была сложной: в течение 100 с подавали раствор *A*, потом в течение 9 мин — линейный градиент (2 — 96%) раствора *B* в растворе *A*, но с изократической «площадкой» в интервале 335—355 с от начала элюции. Авторы подчеркивают необходимость тщательной очистки реагентов. Ацетонитрил (фирмы «J. T. Baker») пропускали для очистки через колонку «Zorbax ODS»; ТФУ перегоняли над CrO_3 , а потом над Al_2O_3 ; воду деионизовали и перегоняли [Hawke et al., 1982]. Нет смысла увеличивать число примеров, тем более что при всем их разнообразии можно усмотреть общие черты подхода к обратнофазовой гидрофобной хроматографии ФТГ-производных аминокислот. Почти во всех случаях в качестве водного компонента элюента используют разбавленный ацетатный (Na^+ или NH_4^+) буфер с pH 4—5. Концентрация основного органического растворителя в смеси (этанола, метанола или ацетонитрила) достигает 40—50%. Температура элюции 40—60°, скорость до 2 мл/мин при диаметре колонки менее 0,5 см. Во всех цитированных случаях использовали силикагели, модифицированные октадецилсиланом. Впрочем, описаны варианты фракционирования ФТГ-АК и на других сорбентах, например на « μ Bondapak-phenylalkyl» [Henderson et al., 1980].

Выбор варианта зависит от технических средств, опыта и традиций данной лаборатории. В любом случае при первоначальной отработке методики, а также для каждой новой колонки или партии силикагеля требуется терпеливый поиск оптимальных условий хроматографии. Это не так уж обременительно, если учесть, что при грамотной эксплуатации на одной колонке можно провести до 1000 опытов. Раз установленные условия хроматографии должны очень точно и по всей совокупности рабочих параметров воспроизводиться от опыта к опыту. Основное назначение хроматографии ФТГ-АК, как мы видели, состоит в идентификации одиночных аминокислот в ходе секвенирования белка. При этом не возникает затруднений с разделением пиков, но зато решается еще более трудная задача — по положению пика на профиле хроматографической элюции (по времени задержки на колонке) надежно идентифицировать аминокислоту. Незначительные изменения pH, температуры, состава смеси или скорости элюции могут привести к «сдвигу» пика в ту или другую сторону, а такой сдвиг, даже если он измеряется секундами по времени задержки, может повлечь за собой ошибку в идентификации. Сюда надо добавить постепенное «старение» колонки — изменение ее характеристик. Состояние колонки надо контролировать, периодически проверяя калибровку метода путем хроматографии стандартного набора ФТГ-АК.

Если фенилизотиоцианат реагирует не с полипептидом, а с аминокислотой, то образуется ее фенилтиокарбамильное производное (ФТК-АК). Привнесенная гидрофобность позволяет разделять производные различных аминокислот обратнофазовой ЖХВД на колонках типа C_8 и C_{18} . ФТК-АК хорошо поглощают свет при 254 нм, что позволяет идентифицировать хроматографические пики при по-

мощи обычных УФ-детекторов. Модификация занимает 5—10 мин при комнатной температуре; производные устойчивы — ФТК-АК можно длительно хранить до начала фракционирования. Пролин (в отличие от метода с использованием ОФА) модифицируется так же хорошо, как остальные аминокислоты. Лизин модифицируется по обеим аминокислотным группам, что удваивает его молярную экстинкцию; это легко учесть при проведении количественных оценок содержания аминокислот. Чувствительность метода — не хуже, чем у современных аминокислотных анализаторов. При этом нет необходимости избегать присутствия кислорода, что, как известно, является источником немалых трудностей при секвенировании полипептидов по методу Эдмана [Heinrikson, Meredith, 1984].

РАЗДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ В ГРАДИЕНТАХ АЦЕТОНИТРИЛА И СПИРТОВ

Обратнофазовую гидрофобную хроматографию используют обычно для разделения относительно мелких пептидов, например трипсиновых гидролизатов белка. Ввиду наличия в составе пептидов как гидрофобных, так и гидрофильных аминокислотных остатков их взаимодействие с гидрофобизированной матрицей оказывается не слишком сильным, и в практике встречаются режимы хроматографической элюции, сходные с описанными для ФТГ-АК.

Так, Ханкок и соавторы еще в 1978 г. описали фракционирование трипсинового гидролизата белка актинидина на колонке « μ Bondapak-C₁₈» (0,4 × 30 см) в течение 15 мин со скоростью 1,5 мл/мин линейным градиентом (5—20%) раствора ацетонитрила в 0,1%-ном водном растворе ортофосфорной кислоты. В зависимости от числа пептидов можно было вносить на колонку от 0,1 до 2 мкг исходного гидролизата белка при условии, что детектирование велось по оптической плотности немодифицированных пептидов в области 205—225 нм. Прозрачность ацетонитрила в этом диапазоне длин волн — весьма существенное обстоятельство. То же самое относится к ортофосфорной кислоте и фосфатным буферам [Hancock et al., 1978]. Надо заметить, что требования к хроматографии пептидов не так строги, как в случае идентификации ФТГ-АК по времени задержания на колонке. Здесь речь идет лишь о разделении пептидов или о сравнении картин фракционирования гидролизатов двух сопоставляемых полипептидов. Аналогичная методика была использована годом позже для фракционирования трипсинового гидролизата другого белка (Са-связывающего белка кишечника быка и птиц). На такой же колонке и с той же линейной скоростью нарастания концентрации ацетонитрила (1% в минуту) элюцию большого числа пептидов вели несколько дольше — примерно в течение часа [Fullmer, Wasserman, 1979]. Недавно элюцию ацетонитрилом использовали для фракционирования пептидов на « μ -Bondapak-C₁₈» (тоже в течение часа) тремя последовательными линейными градиентами концентрации

ацетонитрила нарастающей крутизны в 0,02 М К-фосфатном буфере, pH 2,2. Детектирование вели по УФ-поглощению одновременно при двух длинах волн (254 и 214 нм) с помощью детектора «Holo-chrom» фирмы «Gilson» [L'Italien, Laursen, 1981].

При элюции с колонки «Bio-Rad ODS» линейным градиентом (0—60%) ацетонитрила в присутствии 0,1 М NaClO₄ (хаотропный агент) при pH 7,4 или 2,1 было показано, что время задержания на колонке любого пептида длиной до 20 аминокислотных остатков можно предсказать по его известному аминокислотному составу. Оказалось, что каждая аминокислота дает свой вклад в задержание пептида и что эти вклады аддитивны. Для указанных условий автор приводит таблицу слагаемых времен задержания за счет каждой аминокислоты. Отмечается хорошая корреляция подсчитанных таким образом времен задержания различных пептидов с литературными данными и с результатами специально поставленных экспериментов [Meek, 1980].

Обратнофазовая гидрофобная хроматография пептидов с элюцией ацетонитрилом дает хорошие результаты, однако, как уже упоминалось, этот растворитель дорог, трудно хранится и очень токсичен. Поэтому привлекают внимание работы, где в качестве органической составляющей элюента использовались спирты.

Рейнболт и соавторы для фракционирования пептидов трипсинового гидролизата рибосомального белка S2 на колонке «Li Chrosorb RP-18» при температуре 40° использовали линейный градиент (0—80%) метанола в смеси с 2,7 мМ аммоний-ацетатным буфером (pH 4,2). Из 28 пептидов гидролизата 22 элюировались в виде отдельных пиков. Такой же градиент концентрации метанола, но в смеси с 0,05%-ной ТФУ (вариант ион-парной хроматографии) использовали для фракционирования на колонке «Beckman RP-18» трипсинового гидролизата одного из крупных BrCN-пептидов Asp-тРНК-синтетазы из дрожжей. Отмечается хорошее разделение гидрофобных пептидов. Использование легколетучих буферов облегчает переход к последующему секвенированию пептидов [Reinbolt et al., 1983].

Описано фракционирование радиоактивно меченных пептидов трипсинового гидролизата белка на колонке «Spherisorb ODS» (0,46 × 25 см) линейным градиентом (0—62,5%) этанола в 4,5%-ном растворе HCOOH. Фракционирование вели при температуре 40° со скоростью элюции 1,4 мл/мин в течение 95 мин [Smart et al., 1981]. В растворах с высоким содержанием этанола (как и ацетонитрила) растворимы не все пептиды. Хроматографию труднорастворимых пептидов иногда удается осуществить, используя в качестве органического растворителя пропанол. В силу своей большей, чем у этанола, гидрофобности пропанол элюирует с октадециловых колонок даже крупные пептиды при концентрации менее 20%. Относительно высокая вязкость пропанола заставляет снижать скорость элюции, но для крупных пептидов это все равно необходимо делать ввиду их замедленной диффузии.

Рубинштейн и соавторы описали разделение пептидов трипсинового гидролизата на колонке «Lichrosorb RP-18» (0,32 × 25 см),

первоначально уравновешенной раствором, содержащим 0,5 М пиридин и 1 М НСООН. Элюцию вели линейным градиентом (0—20%) пропанола в том же пиридин-формиатном буфере со скоростью 0,23 мл/мин ($175 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$) в течение 100 мин. Использовали упрощенный вариант технического осуществления элюции: один насос «Milton Roy», смеситель градиента фирмы «ЛКВ», стоящий на стороне низкого давления перед насосом, и инжектор фирмы «Altex». Детектирование вели по флюоресценции: половину элюента с выхода колонки отводили, смешивали с флюоресцамином и направляли в проточный флюориметр [Rubinstein et al., 1979]. Сходную систему для фракционирования пептидов трипсинового гидролизата интерферона описали недавно Леви и соавторы. Они использовали менее гидрофобный сорбент «Ultrasphere-Octyl» (диаметр гранул 5 мкм) в колонке размером $0,46 \times 25 \text{ см}$, а элюцию вели линейным градиентом (0—40%) пропанола в пиридин-формиатном буфере; фракционирование занимало около 3 ч [Levy et al., 1981].

ИОН-ПАРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПЕПТИДОВ

Обратнофазовая гидрофобная хроматография пептидов в ион-парном варианте элюции («ион-парная хроматография») завоевала в последние три года широкое признание. Недавняя работа Беннет и соавторов посвящена очистке адренокортикотропного гормона (АКТГ) — пептида, состоящего из 39 аминокислотных остатков. Для ион-парной хроматографии с элюцией градиентом концентрации ацетонитрила они в качестве источников гидрофобных контрионов использовали трифторуксусную (ТФУ) и гептафтормасляную (ГФМК) кислоты. Прежде чем привести их методику очистки АКТГ, целесообразно привести из той же работы наглядный пример влияния выбора контриона на результат хроматографического фракционирования пептидов. Смесь семи пептидных гормонов фракционировали дважды на одной и той же колонке « μ Bondapak- C_{18} » одинаковым линейным градиентом концентрации ацетонитрила (20—40%) и с одинаковой скоростью, но в одном случае элюент содержал 0,01 М ТФУ, а в другом — 0,01 М ГФМК. Как видно из сопоставления верхнего и нижнего профилей на рис. 94 (высокий фон на нижнем профиле — поглощение ГФМК при 210 нм), смена контриона коренным образом изменяла не только расположение пиков пептидов на профиле элюции, но даже порядок их выхода из колонки. Это обстоятельство и использовали для двухступенчатой очистки АКТГ. Экстракт из надпочечников крысы в кислом солевом растворе (1 М НСl с 5% НСООН, 1% NaCl и 1% ТФУ) пропускали предварительно через короткую ($1 \times 1,5 \text{ см}$) колонку « C_{18} -Sep Pak» (фирмы «Waters»). Гормон на ней задерживался, а большая часть постороннего материала вымывалась 0,1%-ным раствором ТФУ. Затем АКТГ снимали с колонки 80%-ным раствором ацетонитрила в 0,1%-ной ТФУ и разбавляли 0,1%-ной ТФУ до концентрации 13,3% по ацетонитрилу. На первом этапе хроматографической очистки гор-

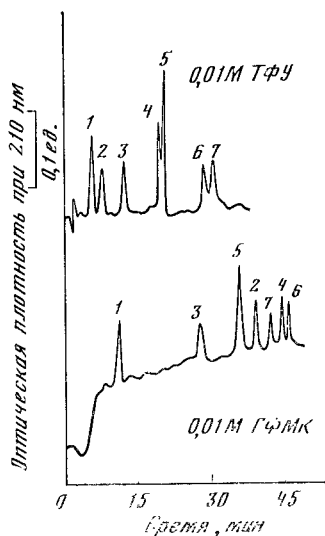


Рис. 94. Фракционирование семи пептидных гормонов (1—7) ион-парной хроматографией на колонке « μ Bondapak- C_{18} » с добавлением разных гидрофобных контрионов (см. текст) [Bennet et al., 1981]

мона элюцию с колонки « μ Bondapak- C_{18} » вели линейным градиентом (20—40%) концентрации ацетонитрила в 0,1%-ной ТФУ со скоростью 1,5 мл/мин в течение часа. Регистрировали УФ-поглощение при 210 нм: фракции с интервалом в 1 мин собирали в пробирки коллектора и иммунными методами обнаруживали в них присутствие АКТГ (рис. 95). Эти фракции объединяли и разбавляли вдвое 0,13%-ным раствором ГФМК. На этапе II собранный после этапа I материал фракционировали на той же самой колонке линей-

ным градиентом концентрации ацетонитрила (33,6—41,6%), но уже в 0,13%-ном растворе ГФМК. Результаты этого фракционирования показаны на рис. 90 справа. Благодаря смене гидрофобного контриона примеси отделились, а хорошо очищенный АКТГ вышел в составе двух близко расположенных компонентов [Bennett et al., 1981]. Похожий прием был использован для очистки фибринопептидов, отщепляемых тромбином от фибриногена [Koehn, Canfield, 1981].

При разделении относительно крупных бромциановых пептидов α -, β - и γ -цепей глобина человека 0,1%-ный раствор ТФУ, помимо своей роли в осуществлении ион-парной хроматографии, оказался очень полезен как прекрасный растворитель для пептидов, в частности гидрофобных. Кроме того, раствор ТФУ прозрачен вплоть до $\lambda = 216$ нм и легко удаляется лиофилизацией. Фракционирование вели на колонке «Lichrosorb RP-8» ($0,46 \times 50$ см). Использование сорбента с меньшей, чем в рассмотренных выше примерах, гидрофобностью обусловлено большими размерами пептидов. Колонку уравнивали 0,1%-ным водным раствором ТФУ, впрыскивали в нее 100 мкл смеси пептидов и вели элюцию линейным градиентом концентрации изопропанола (от нуля со скоростью нарастания 1,6% в минуту) в течение 1 ч при температуре 28° и скорости подачи элюента 0,7 мл/мин. Профиль элюции показан на рис. 96 (сплошная линия). Пептиды длиной 32, 43 и 64 аминокислотных остатка хорошо отделились друг от друга [Mahoney, Hermodson, 1980].

Двумя годами позже Махони опубликовал результаты фракционирования BrCN-пептидов гемоглобина на сорбенте с такой же модификацией (C_8), но на основе крупнопористого (300 Å) силикагеля

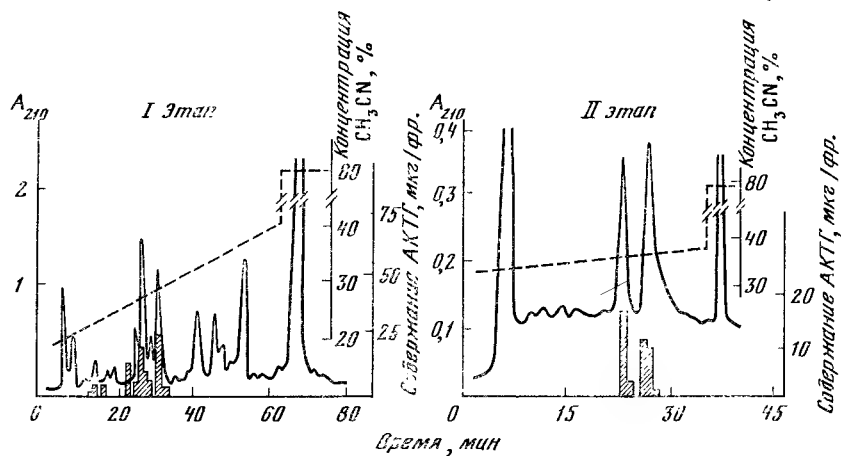
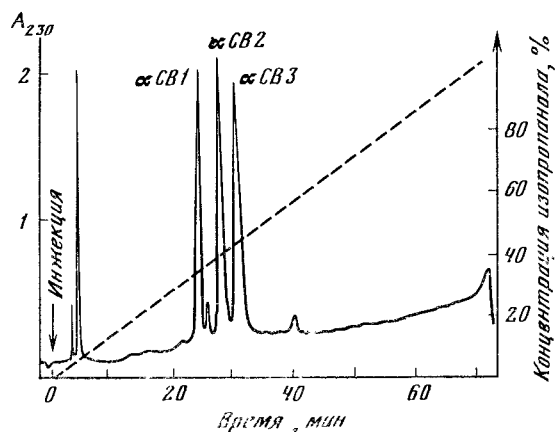


Рис. 95. Очистка АКТИ крысы двухступенчатой ионной хроматографией на колонках « μ Bondapak- C_{18} » [Bennet et al., 1981]

Сплошная линия — профиль элюции (A_{210}); пунктир — концентрация ацетонитрила, %; гистограммы указывают содержание гормона во фракциях

Рис. 96. Разделение крупных BrCN-пептидов α -цепи гемоглобина человека на колонке «Lichrosorb RP-8» [Mahoney, Hermodsen, 1980]



марки «Synchron RP-P» (10 мм) линейным градиентом концентрации пропанола (0—60%). Он сопоставлял эффекты использования в качестве растворителей и источников гидрофобных контрионов 0,1 %-ных растворов ТФУ, ГФМК и пентафторпропионовой кислоты. Как и в цитированной выше работе Беннет и соавторов, при смене растворителей не только сдвигались профили элюции в целом, но и изменялось взаимное расположение пиков, что открывает дополнительные возможности для разрешения близко идущих по колонке пептидов [Mahoney, 1982].

Сметим, что Махони в числе достоинств всех трех растворителей, кроме летучести, отмечает их почти полную прозрачность в диапазоне длин волн 206—230 нм. Возможно, что фон поглощения ГФМК при 210 нм в работе Беннет и соавторов был обусловлен недостаточной очисткой этого растворителя.

Ион-парной хроматографией в присутствии 0,2%-ного раствора ГФМК последовательно на двух различных колонках C_{18} -силикагеля с элюцией линейными градиентами концентрации ацетонитрила (0—50% и 32,5—40%) удалось очистить и разделить две очень близкие формы фактора роста из эпидермиса слюнной железы мыши [Burgess et al., 1982].

В целях получения пептидов коллагена I из шкуры телянка, удобных для определения его полной аминокислотной последовательности, были использованы четыре последовательных этапа ион-парной хроматографии. На 1-м этапе материал α -цепи (отделенный гель-фильтрацией на сорбенте «Spherogel TSK 4000 SW») разделяли на две фракции, α_1 и α_2 . На 2-м этапе фракционировали бромциановые пептиды α_1 , на 3-м — разделяли короткие пептиды, полученные в результате гидролиза одного из BrCN-пептидов трипсином. На всех этих этапах элюцию вели линейными градиентами концентрации ацетонитрила в присутствии 0,1% ГФМК. На 4-м этапе некоторые из плохо разделившихся пиков рехроматографировали снова в градиенте концентрации ацетонитрила, но с заменой ГФМК на ТФУ. В качестве сорбента на всех четырех этапах использовали крупнопористый C_{18} -силикагель марки «Vydac TP201» в колонках размером $0,46 \times 25$ см; скорость элюции 1 мл/мин [Van der Rest, Fietzek, 1982].

В начале 1982 г. было опубликовано исследование, посвященное сопоставлению возможностей использования RP-8-, RP-18- и фенил-силикагелей для фракционирования трипсиновых пептидов в двух вариантах линейной градиентной элюции: обычного градиента концентрации пропанола при pH 4 и ион-парной хроматографии с градиентом концентрации ацетонитрила. Были выбраны следующие комбинации растворителей при элюции пропанолом: раствор А — 0,25 М пиридин в 0,9 М CH_3COOH (pH 4); раствор В — 60%-ный раствор пропанола в растворе А. При ион-парной хроматографии использовали следующие комбинации: раствор А — 0,09%-ный водный раствор ТФУ; раствор В — смесь ТФУ, воды и ацетонитрила в пропорции 0,09 : 9,91 : 90. В обоих случаях использовали линейный градиент (0—70%) раствора В в смеси с раствором А.

Авторы исследования отдают предпочтение сорбенту « μ -Bondapak-Phenyl» при ион-парной хроматографии. По их данным, алкилфенильный сорбент хорошо разделяет как крупные пептиды (до $M = 25\ 000$), так и мелкие. При скорости элюции 0,8 мл/мин ($400\text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$), комнатной температуре и среднем размере гранул 10 мкм на колонке указанного типа размером $0,39 \times 30$ см они получали симметричные пики пептидов в то время как на октиловой («Ultrasphere RP-8»; 5 мкм; $0,46 \times 25$ см) и октадециловой («Zorbax ODS»; 6 мкм; $0,46 \times 25$ см) колонках в аналогичных условиях элюции пики оказывались несимметричными. Предполагается, что фенильные группы лучше закрывают остаточные силанолы на поверхности силикагеля, чем алкильные модификаторы [Yuan et al., 1982]. Следует отметить, что во всех цитированных примерах использова-

ли сорбенты, не предназначенные специально для ион-парной хроматографии.

Отметим также, что ион-парная хроматография с элюцией градиентом концентрации (24—48%) пропанола в 0,1%-ной ТФУ была использована для очистки крупных природных полипептидов (до $M = 10\,000$) на еще менее гидрофобном сорбенте « μ Bondapak-CN» [Roberts et al., 1981].

Недавно [Dizdaroglu, Krutzsch, 1983] было проведено сопоставление возможностей фракционирования трипсиновых пептидов «малого основного белка» миелина крысы ион-парной обратнофазовой хроматографией на колонке «Supelcosil LC-8-DB» и ионообменной — на слабом анионообменнике «MicroPak AX-10». В первом случае элюцию вели градиентом ацетонитрила в присутствии 0,1%-ной ТФУ, во втором — градиентом концентрации триэтиламоний-ацетатного буфера в ацетонитриле. Авторы приходят к выводу, что два метода дополняют друг друга. При ХОФ хуже разделяются короткие пептиды, но лучше — длинные (от пента- до додекапептидов).

РАЗДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ

Использование обратнофазовой гидрофобной хроматографии для определения нуклеотидного состава ДНК и РНК встречается довольно редко, возможно, потому, что эта задача проще решается методом ТСХ. Тем не менее ЖХВД здесь может оказаться предпочтительнее в случае необходимости проведения экспресс-анализа на наномолярном уровне. Мисхе и Викстром осуществляли такой анализ на колонке «Spherisorb ODS» ($0,32 \times 25$ см). 1—20 мкмоль ферментативного гидролизата ДНК (результат исчерпывающей обработки ДНКазой I, щелочной фосфатазой и фосфодиэстеразой змеиного яда) или смеси, содержащей по 1—15 нмоль каждого из дезоксирибонуклеозидов, вносили на колонку и элюировали линейным градиентом концентрации метанола (0—25%) в 0,05 М водном растворе KH_2PO_4 (рН 5,5). Раствор фосфата обрабатывали активированным углем и фильтровали через миллипорный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм ($A_{254} < 0,03$; $A_{220} < 0,05$); метанол перегоняли ($A_{254} = 0,009$; $A_{220} = 0,204$). Элюцию вели при комнатной температуре со скоростью 1 мл/мин под давлением 160 атм; концентрация метанола в элюенте увеличивалась на 1% в минуту. В течение 25 мин из колонки острыми пиками выходили дезоксирибонуклеозиды со следующими временами задержки: Цн — 5 мин, дТн — 10, дГн — 11 и дАн — 20,6. Выход дезоксирибонуклеозидов составлял 95—100% [Mischke, Wickstrom, 1980].

Проведенное в той же работе аналогичное фракционирование полного ферментативного гидролизата тРНК позволило идентифицировать и минорные рибонуклеозиды со следующими временами задержки:

Нуклеозид	Время задержки, мин	Нуклеозид	Время задержки, мин
D	1,8	s ⁶ G	16,1
ψ	4,1	G	17,3
C	6,0	m ⁷ G	20,0
U	6,5	ac ⁴ C	24,1
s ⁴ U	8,2	m ³ G	25,4
m ⁵ C	10,1	G _m	28,7
T	11,1	A	32,4
C _m	11,9	m ² G	36,8
m ¹ A	14,7		

Обозначения миноров и сведения об их структуре и функциях можно найти в обзоре [Остерман, 1980]. Скорость элюции была уменьшена до 0,8 мл/мин, а градиент концентрации метанола был более пологим — 0,3 % в минуту.

Kuo и соавторы анализировали нуклеозидный состав гидролизата ДНК (включая и метилированные дезоксирибонуклеозиды) на колонке «μ Bondapak-C₁₈» с элюцией двухступенчатым градиентом концентрации метанола: 2,5 и 8 % метанола в 0,01 М (NH₄)₂PO₄ с pH 5,3 и 5,1 соответственно [Kuo et al., 1980]. Точно такой же ступенчатый градиент, но с иными продолжительностями ступеней, был использован для разделения рибонуклеозидов на колонке, заполненной в лабораторных условиях сорбентом «ODS-Hypersil» [McLaughlin et al., 1981].

Новый аспект исследования обратнофазовой ЖХВД для фракционирования минорных рибонуклеозидов, входящих в состав транспортных РНК, обсуждается в недавней работе Бак и соавторов [Buck et al., 1983]. Обычно для анализа содержания миноров в тРНК используют тонкослойную хроматографию рибонуклеозидов, меченных тритием посредством периодатного окисления рибозы с последующим восстановлением диальдегида обработкой [³H]-NaBH₄ (метод Рандерата), или рибонуклеотидов, меченных фосфором с помощью T₄-полинуклеотидкиназы. В первом случае из сферы анализа совсем выпадают миноры, метилированные по рибозе, а некоторые нуклеозиды, особенно тиолированные, разрушаются. Во втором случае ферментативное фосфорилирование идет неодинаково полно для различных миноров, что затрудняет проведение количественных анализов. Авторы тщательно отработали условия эксперимента, позволившего им в ходе одного хроматографического фракционирования на колонке «Supelco C18» за 48 мин разделить 29 минорных нуклеозидов из тРНК бактериального происхождения. Элюцию вели сложным градиентом концентрации ацетонитрила (от 0 до 40 %) в растворе ацетата аммония, pH 6.

Гидрофобная хроматография нуклеотидов возможна при условии, что гидрофильность остатка фосфорной кислоты подавлена благодаря близкому соседству малоподвижного гидрофобного коптр-

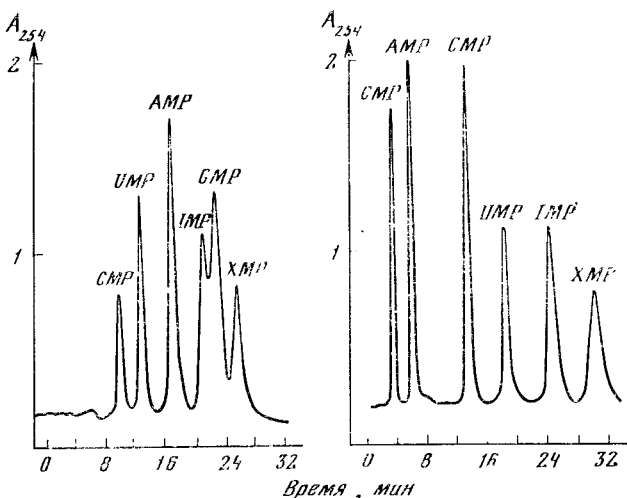


Рис. 97. Влияние добавления тетрабутиламмония (ТБА) в качестве ион-парного агента на характер фракционирования рибонуклеотидов на колонке (0,4 × 30 см) « μ Bondapak-C₁₈» [Walseth et al., 1980]

А — изократическая элюция 5%-ным метанолом, подкисленным до pH 2,5 добавлением ПСООН; Б — то же, но в присутствии 5 мМ ТБА

иона, т. е. в варианте ион-парной хроматографии. В качестве таких контрионов были опробованы тетраметиламмоний (ТМА), тетраэтиламмоний (ТЭА) и тетрабутиламмоний (ТБА). Их использовали в виде растворов соответствующих солей муравьиной кислоты, титрованных ею до pH 2,5. Элюцию вели изократически — неизменной концентрацией метанола в указанных формиатных буферах. Были найдены оптимальные концентрации для контрионов: 10–40 мМ для ТМА, 1–5 мМ для ТЭА и 0,5–5 мМ для ТБА. Концентрацию метанола следует подбирать в зависимости от типа катиона и сорбента. Например, для трех опробованных сорбентов одного и того же типа и ТБА в качестве гидрофобного катиона были найдены следующие оптимальные концентрации метанола: « μ Bondapak-C₁₈» — 5%, «Spherisorb ODS» — 8%, «Ultrasphere ODS» — 12%. На рис. 97 представлено разделение смеси нуклеотидов при элюции 5%-ным раствором метанола в 5 мМ ТБА-формиате, pH 2,5. Интересно отметить, что показанный на рисунке порядок выхода нуклеотидов при переходе от ТБА к ТЭА и ТМА сохраняется для пяти из них, но нарушается для UMP, который при этих заменах перемещается каждый раз на одну ступень «влево» и выходит в ТЭА после AMP, а в ТМА — после CMP [Walseth et al., 1980]. Не исключено, что такая сильная зависимость задержания UMP от размера контриона как-то связана с тем обстоятельством, что урацил — единственное из четырех нуклеиновых оснований, не имеющее аминогруппы.

Разделение нуклеозидов, нуклеотидов, цикломонофосфатов и динуклеозидомонофосфатов удастся провести на колонке « μ Bon-

«apak-C₁₈» и без помощи «жирных» катионов — путем элюции линейным градиентом концентрации ацетонитрила (2—12%) в 1%-ном растворе CH₃COONH₄, pH 5,9 [McFarland, Borer, 1979]. Авторы утверждают, что в аналогичной системе можно фракционировать и гомеолигонуклеотиды вида (Np)_nN вплоть до $n = 11$. Интервал градиента концентрации ацетонитрила зависит от степени гидрофобности основания: 1—3% для C, 2—7% для U и 7—8,5% для A. Кристиан провела разделение и количественную оценку содержания 5-метилдезокситидиловой кислоты наряду с обычными нуклеотидами ферментативного гидролизата меченой ³²P ДНК посредством изократической элюции 0,5 М Na-фосфатным буфером (pH 5,5) с кололки «Spherisorb-10 ODS» [Christman, 1982].

Рамо и Шофстол на колонке «Ultrasphere ODS» путем изократической элюции 0,05 М NH₄-фосфатным буфером (pH 5) в смеси метанол—вода (1 : 9) разделяли нуклеиновые основания, нуклеозиды, 2'-, 3'- и 5'-нуклеозидмонофосфаты, а также 2', 3'- и 3',5'-нуклеозидцикломонофосфаты [Ramos, Schoffstall, 1983]. Ассенца и соавторы описали отделение цикломонофосфатов от соответствующих нуклеиновых оснований, нуклеозидов, их моно-, ди- и трифосфатов, а также разделение различных нуклеозидциклофосфатов между собой на колонке «Zorbax-ODS» в режиме изократической элюции слабым NH₄-фосфатным буфером при pH 3 [Assenza et al., 1983a]. Те же авторы предложили аналогичную систему изократического фракционирования ряда модифицированных «минорных» нуклеозидов и дезоксирибонуклеозидов. Кроме такого же буфера, но с pH 4, в состав элюента вводили 2% метанола [Assenza et al., 1983b].

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКОВ

Рассмотрению возможностей обратнофазовой гидрофобной хроматографии белков в основном посвящен сравнительно недавно опубликованный обзор [Rubinstein, 1979]. Основные его выводы совпадают с тем, что было сказано выше при рассмотрении обратнофазовой гидрофобной хроматографии пептидов. Для белков с молекулярной массой в интервале 12—30 тыс. Дальтон автор отдает предпочтение силикагелям, модифицированным октилсиланом (C₈). В качестве органического компонента элюента, по его мнению, следует предпочесть градиент концентрации пропанола, вплоть до 40%-ной концентрации, если позволяет растворимость белка. Для получения узких пиков рекомендуется в качестве водного компонента использовать буфер высокой (примерно 1 М) концентрации, подавляющий ионное взаимодействие белка с силанольными группами матрицы. При pH 5—6 разрешение получается обычно хуже, чем при pH 4 (форматно-пиридиновый буфер) или 7,5 (Na-ацетатный буфер). Существенно указание на то, что скорость элюции следует снизить до 60—90 мл/см²·ч. Продолжительность фракционирования белков при этом остается относительно небольшой — 1—3 ч. Белки целесообразно разделить предварительно на группы

по размеру (путем гель-фильтрацией), с тем чтобы для каждой группы можно было бы подобрать оптимальные условия хроматографии. Указывается, что загрузку колонки размером $0,46 \times 25$ см можно доводить до 50 мг (на примере рибонуклеазы) без ухудшения разрешения белковых пиков. В опубликованном годом позже обзоре по ЖХВД белков [Regnier, Gooding, 1980], в разделе, посвященном обратнофазовой гидрофобной хроматографии, не содержится существенно новых элементов, кроме указания на целесообразность использования ион-парного варианта такой хроматографии, о чем было достаточно сказано выше. В частности, рекомендуется использовать ТЭА-фосфатный буфер в сочетании с градиентом концентрации пропанола.

Белки относительно малых размеров можно фракционировать и на колонках типа C_{18} ; при условии их растворимости в ацетонитриле можно использовать для элюции градиент его концентрации вплоть до 60% [Nice et al., 1979]. Рассматривая важную проблему денатурации белков в процессе хроматографии, авторы отмечают, что опасность связана не столько с относительно кратковременным пребыванием белка в водно-органическом растворителе, сколько с самим актом гидрофобного взаимодействия белка с матрицей. В результате этого взаимодействия могут нарушиться внутренние гидрофобные связи в белковой глобуле, от которых зависит сохранение ее нативной структуры.

Недавно было описано весьма успешное фракционирование методом обратнофазовой гидрофобной ЖХВД гистонов из ядер тимуса теленка (правда, задача сохранения нативности белков здесь не ставилась). Экстрагированные, как обычно, 0,25 н. HCl гистоны пересаждали ацетоном и денатурировали 3-минутным кипячением в растворе, содержавшем 1% ДДС-Na и 0,01% β -меркаптоэтанола. Такая денатурация необходима для восстановления цистеина в гистоне H^3 — без нее он выходит в виде димера. В колонку «ODS-Hypersil» (размер гранул 5 мкм), уравновешенную 0,1 М раствором $NaClO_4$ в 0,1%-ной H_3PO_4 , pH 2,4 (хаотропные агенты), вносили до 1 мг суммарного белка и в течение 10 мин вымывали аминокислоты и пептиды линейным градиентом концентрации (0—35%) ацетонитрила в том же буфере со скоростью 1 мл/мин. Элюцию гистонов вели в течение последующего часа при той же скорости (!) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (35—60%). Детектирование осуществлялось по УФ-поглощению при 220 нм. На рис. 98, где показан результат фракционирования, можно различить не менее 10 компонентов смеси. Подфракции пяти основных гистонов разделились лучше, чем при электрофорезе, однако их выход, по данным авторов, был далеко не полным. По-видимому, часть гистонов прочно сорбируется на колонке. Разделение идет именно по степени гидрофобности гистонов, а не по их молекулярной массе, о чем свидетельствует тот факт, что гистон $H4$ ($M = 11\ 282$) выходит раньше, чем $H2A$ ($M = 14\ 004$) [Certa, von Ehrenstein, 1981].

Гёрли и соавторы усовершенствовали эту методику: фракционирование они вели на сорбенте « μ Bondapak- C_{18} », в котором свобод-

ные силанольные группы блокированы при изготовлении; кроме того, авторы применили вариант ион-парной хроматографии, осуществляя элюцию градиентом концентрации ацетонитрила (20—60%) в 0,3%-ном растворе трифторуксусной кислоты. Это позволило получить хорошее разрешение с высоким выходом материала [Gurley et al., 1983].

На колонке с тем же сорбентом ($0,39 \times 300$ см) были успешно разделены щелочные белки малой субъединицы рибосом *E. coli*. Элюцию вели линейным градиентом концентрации ацетонитрила (20—50%) в 0,1%-ном растворе ТФУ. 21 белок субъединицы распределялся по 15 хроматографическим пикам [Kerlavage et al., 1982]. Несколько усложнив характер элюции ацетонитрилом (комбинация выпуклого и линейного градиентов с изократическими участками) в присутствии 0,1%-ной ТФУ и заменив сорбент на «Synchropak RP-C₁₈», те же авторы сумели получить 17 хроматографических пиков для малой субъединицы рибосом *E. coli*, 22 пика — для большой и 31 пик — для суммарного рибосомального белка [Kerlavage et al., 1983].

Петридес и соавторы, используя обратнотазовую гидрофобную ЖХВД на колонке «Supelcosil-C₁₈» (5 мкм; фирма «Supelco») размером $0,46 \times 15$ см, сумели разделить мутантные цепи гемоглобина, различающиеся между собой всего лишь одной аминокислотой. На колонку вносили 20—40 мкг белка, растворенного в 1 мл 0,2 М CH_3COOH , и элюировали его в изократическом режиме — раствором пропанола в 1 М пиридин-форминатном буфере, рН 3. Скорость элюции была не очень высокой — 0,6 мл/мин ($218 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$). Примечательно, что точный выбор концентрации пропанола оказался очень существенным. Для разных пар мутантных гемоглобинов подбирали свою концентрацию, причем необходимые вариации оказались очень тонкими: 25,8; 26,6 и 26,9% [Petrides et al., 1980].

В аналогичной системе, но на колонке «Lichrosorb RP-8» ($0,46 \times 25$ см) Стейн и соавторы проводили заключительный этап очистки интерферона фибробластов человека. Элюцию в этом случае вели осторожным ступенчатым градиентом пропанола, увеличивая его концентрацию в пиридин-форминатном буфере (рН 4,2) с 30% на 2% через каждые 40 мин элюции. Интерферон выходил в конце элюции 32%-ным пропанолом (рис. 99). Полезно отметить, что скорость элюции в этой работе была почти вдвое меньшей, чем в предыдущей, — $130 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$ [Stein et al., 1980].

Ввиду своей практической важности заслуживает более подробного рассмотрения недавно описанное тонкое фракционирование лейкоцитарного интерферона человека.

После предварительной очистки суммарного препарата переосаждениями (1,5%-ная ТХУ, 0,5 М CH_3COOH и 4%-ная ТХУ), а затем гель-фильтрацией на сефадексе G-100 в присутствии 4 М мочевины, было использовано три последовательных этапа очистки с помощью ЖХВД (рис. 100). На 1-м этапе 160 мл препарата после сефадекса G-100 вносили на препаративную колонку «Lichrosorb RP-8» (1×25 см), уравновешенную 1 М CH_3COONa (рН 7,5) с 0,1% триглицоля (буфер А). Элюцию вели двумя следующими друг за другом линейными градиентами концентрации пропанола в буфере А, 0—20% (30 мин)

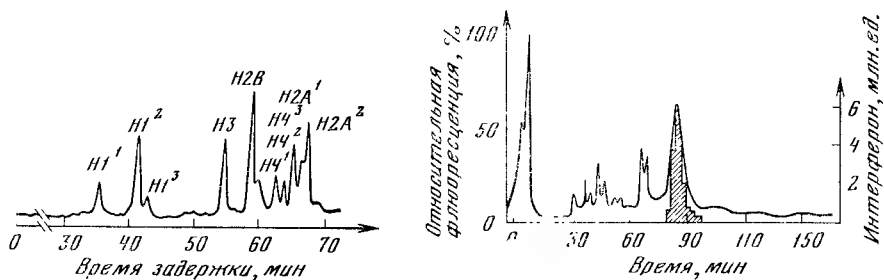


Рис. 98. Фракционирование гистонов тимуса теленка на колонке «ODS-Hypersil» (см. текст) [Certa, von Ehrenstein, 1984]

Рис. 99. Заключительный этап очистки интерферона из фибробластов человека на колонке «Lichrosorb RP-8» [Stein et al., 1980]

Сплошная линия — профиль элюции по флуоресценции; заштрихованный участок соответствует активности интерферона

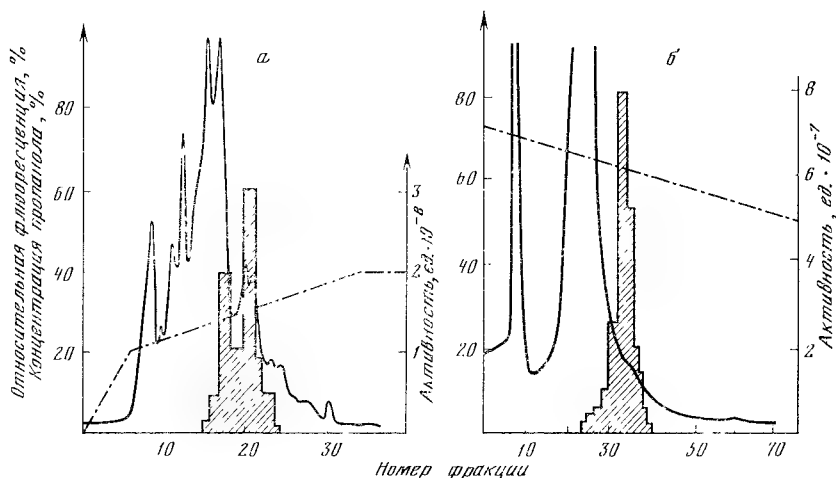
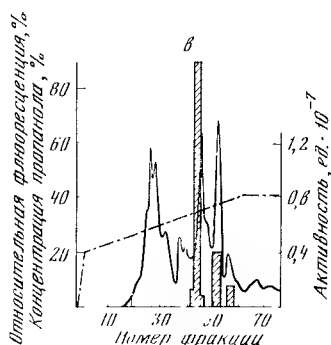


Рис. 100. Три последовательных этапа хроматографической очистки лейкоцитарного интерферона человека на колонках «Lichrosorb RP-8» (а), «Chromegabond DIOL» (б) и «Lichrosorb RP-8» (в) [Hobbs, Pestka, 1982]

Сплошная линия — профиль элюции по флуоресценции, пунктир — концентрация пропанола; заштрихованные участки указывают активность интерферона



и 20—40% (3 ч), со скоростью 115 мл/см²·ч. Малую долю элюата (0,5%) отвечали для определения содержания белка по флюоресценции (с помощью флюоресцамина), а во фракциях объемом по 9 мл определяли биологическую активность интерферона. На 2-м этапе использовали нормальнофазовую ЖХВД (см. ниже). К объединенным после 1-го этапа очистки фракциям, содержащим интерферон, добавляли пропанол (до 80%) и вносили их на колонку «Chromagabond DIO» (10 мкм; 1 × 25 см), уравновешенную 80%-ным раствором пропанола в разбавленном в 10 раз буфере А. Элюцию вели снижающимся линейным градиентом концентрации пропанола (72,5—50%) в 0,1 М CH₃COONa при комнатной температуре с еще меньшей скоростью (72 мл/см²·ч). В полученном профиле элюции (рис. 95, б) авторы усматривают суперпозицию четырех пиков, обозначенных *a* — *d*. Из материала «пиков» *b*, *c* и *d* (отдельно) пропанол удаляли экстракцией гексаном и испарением в струе CO₂, а затем к водному раствору белка добавляли пиридин до 1 М, HCOOH до 1,4 М и Тритон X-100 до 0,1% (рН 4). Каждый из «пиков» в отдельности вносили на аналитическую колонку «Lichrosorb RP-8» (0,4 × 25 см) и элюировали, как и на 1-м этапе очистки, двумя линейными градиентами концентрации пропанола в том же буфере: 0—20% (10 мин) и 20—40% (3 ч).

Из рис. 95, в видно, что в элюате «пика *c*» обнаруживаются три различные фракции интерферона (*c*₁, *c*₂ и *c*₃). Оказалось также, что «пик *b*» на 3-м этапе очистки распадается на три пика, «пик *d*» — на два. Таким образом, было получено восемь фракций интерферона (общий выход по активности — 23%). Электрофорезом в ПААГ с ДДС-На было показано, что семь из них дают одиночные полосы, а одна (*b*₁) — двойную. Молекулярные массы всех фракций, как оказалось, заключены в интервале 17 600—26 200. Самое интересное состоит в том, что все восемь фракций интерферона обладают качественно различной биологической активностью; это было установлено по соотношению эффектов защиты от различных вирусных инфекций двух объектов — фибробластов человека и культуры клеток почки быка [Hobbs, Pestka, 1982].

Авторы рассмотренной работы предпочли вести фракционирование белков сравнительно небольшого размера на умеренно гидрофобном сорбенте с восьмиуглеродной цепочкой модификатора (C₈). Вопрос об оптимальном выборе длины цепи алифатического модификатора для обратнофазовой гидрофобной хроматографии белков исследовался специально [Nice et al., 1981]. Этих авторов особенно интересовала полнота выхода фракционируемых белков из-за возможности очень прочного гидрофобного взаимодействия их с сорбентом. Сопоставляя сорбенты типа C₁, C₃, C₆, C₈ и C₁₈. Для некоторых белков, например БСА, выход оказывается одинаковым во всех случаях (100%), в то время как для овальбумина разница уровней выхода очень существенна: 35, 78, 57, 22 и 8% соответственно. Авторы приходят к заключению, что хроматографию белков следует вести на сорбентах с трехуглеродными алифатическими модификаторами (C₃). Именно для этой цели фирма «Beckman» недавно возобновила выпуск сорбента на основе крупнопористого силикагеля (300 Å) под названием «Ultropore RPSC» («reversed phase short chain»). Гранулы диаметром 5 мкм заполняют колонки размером 0,46 × 7,5 и 1 × 25 см. В фирменном бюллетене № 5914 «HPLC System for proteins, peptides and amino acids» приведено несколько примеров использования нового сорбента.

При фракционировании гидрофобных белков мембран следует отдать предпочтение сорбентам с относительно слабой степенью гидрофобности. Например, очистку цитохрома Р-450 и родопсина быка успешно вели на колонках « μ -Bondapak CN». Элюцию осуществляли линейным градиентом концентрации органической фазы, начиная от 40 %. Любопытно, что наилучшим вариантом органической фазы оказалась смесь ацетонитрила с пропанолом в пропорции 2 : 1. Элюции градиентом какого-либо одного из этих растворителей отвечала меньшая степень задержания белковых фракций на сорбенте и худшее разрешение соответствующих пиков [Tarr, Crabb, 1983].

Там, где это допускает растворимость белков, вместо пропанола для элюции можно использовать метанол в более высокой концентрации. По такому пути пошли, например, авторы работы, посвященной фракционированию некоторых ферментов биосинтеза фенольных производных из растений. Изократическую элюцию с колонки « μ Bondapak-C₁₈» ($0,4 \times 30$ см) они вели 50 %-ным раствором метанола в 0,1 %-ной CH_3COOH [Blume, Saunders, 1981].

Авторы всех рассмотренных в этом разделе работ пользовались стандартными продажными сорбентами с размером пор 60—100 Å. Мы уже имели случай убедиться в предыдущей главе, что при большой скорости элюции хроматография белков на таких сорбентах идет главным образом на поверхности гранул. Для обратной фазовой гидрофобной хроматографии белков этот вопрос исследовали Льюис и соавторы. На основе крупнопористого продажного силикагеля «Lichrosphere Si-500» (диаметр гранул — 10 мкм, средний размер пор — 500 Å) они в лабораторных условиях приготовили гидрофобизированный сорбент путем присоединения октилтрихлорсилана до уровня 2 % по углероду. Немодифицированные силикольные группы блокировали обработкой триметилхлорсиланом (см. выше). Колонки размером $0,46 \times 25$ см набивали под давлением 330 атм. Элюцию белков вели градиентом концентрации пропанола (0—40 %) в пиридин-формиатном буфере (рН 4) со скоростью 180 мл/см²·ч (эта скорость нам представляется слишком большой). Оказалось, что загрузку такой колонки при сохранении высокой степени разрешения пиков можно было довести до нескольких миллиграммов белка. Аналогичное разделение высокомолекулярных белков ($M \approx 128\,000$) на продажной колонке «Lichrosorb RP-8» с порами размером 100 Å удавалось получить лишь при загрузке в 10 мкг. Авторы отмечают высокую избирательность хроматографии. Так, БСА не снимался с их колонки даже десятью ее объемами 32 %-ного раствора пропанола, но выходил в трех объемах 34 %-ного раствора [Lewis et al., 1980].

Пирсон и соавторы подробно сопоставляли характеристики различных силикагелевых матриц, в частности влияние размера пор и фактора прочности, играющего важную роль при элюции концентрированными (до 80 %) растворами пропанола (высокая вязкость) в 0,1 %-ном растворе ТФУ (ион-парная хроматография). Для адек-

ватности сопоставления модификацию различных продажных силикагелей октилдиметилхлорсиланом авторы производили сами, в одинаковых условиях.

Наилучшее разрешение для белков типа БСА и овальбумина, а также BrCN-пептидов глобина получали на матрицах с размером пор около 300 Å. Для белков с $M > 100\,000$ следует предпочесть силикагели со средним размером пор — порядка 1000 Å. Достаточной прочностью обладает силикагель марки «Vydac TP». Силикагель «Lichrospher Si-300» выдерживает давление лишь до 130 атм, что в указанных условиях хроматографии оказывается недостаточным. Впрочем, как уже указывалось, фракционирование белков, по-видимому, следует вести при относительно малых скоростях элюции и соответственно умеренных перепадах давления; тогда прочность любой силикагелевой матрицы окажется достаточной.

Представляет интерес наблюдение авторов, то при умеренной загрузке колонки разделение белков в отличие от низкомолекулярных соединений мало зависит от длины колонки. Например, расстояние между белковыми пиками не изменяется при переходе от колонки длиной 25 см к колонке длиной 5 см. Такое явление можно объяснить многоточечным связыванием молекул белка с обменником [Pearson et al., 1982]. Аналогичное наблюдение было сделано в цитированной выше работе Махони.

Крупные гидрофобные белки плохо растворимы в воде, но, как правило, хорошо растворяются в концентрированных водных растворах муравьиной кислоты. В состав компактной, с трудом диссоциирующей оболочки полиовируса входят четыре близких по молекулярной массе гидрофобных белка. Их удалось разделить хроматографией на колонке «Aquapore RP-300» с помощью двухстадийного линейного градиента концентрации изопропанола — 10—20% (40 мин) и 20—30% (20 мин) — в 60%-ном водном растворе HCOOH. Замечено, что комплексы белков с ДДС-Na, получающиеся при растворении мембранных белков с помощью детергента, диссоциируют в смеси 60%-ной кислоты с изопропанолом [Heukeshoven, Dernick, 1982].

В заключение отметим, что белки сыворотки кролика удается фракционировать хроматографией на силиконированном пористом стекле типа CPG-10 (240 Å). Элюцию вели линейным градиентом (30—100%) ацетонитрила в 0,01 М Трис-HCl (pH 7,6) [Mizutani et al., 1982].

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Фракционирование фрагментов ДНК и РНК обратноточной гидрофобной ЖХВД пока что не может конкурировать с описанным выше использованием для этой цели системы ХОФ-5. Тем не менее Ушер в 1979 г. описал эксперимент, где в качестве гидрофобного сорбента был использован сополимер 97% трифторхлорэтилена и 3% винилиденфторида (торговое название «Kel-F82»). Рибоолигонуклео-

тиды или смесь рестриктивных фрагментов ДНК он элюировал градиентом концентрации ацетонитрила в 0,1 М ТЭА-ацетатном буфере, т. е. методом нон-парной хроматографии. По данным автора, разделение идет по длине фрагментов, так что эту длину можно определять с помощью калибровочной кривой, построенной по результатам хроматографии известных рестриктивных фрагментов ДНК [Usher, 1979].

НОРМАЛЬНОФАЗОВАЯ ЖХВД

Как уже отмечалось, обратнофазовая гидрофобная хроматография удобнее, чем нормальнофазовая, для большинства биологических молекул, более или менее растворимых в воде. Тем не менее в некоторых случаях для объектов, хорошо растворимых в органических растворителях, интерес представляет нормальнофазовая распределительная хроматография (как было отмечено в начале этой главы), в частности нормальнофазовая ЖХВД. В качестве гидрофильного сорбента здесь можно использовать силикагель, модифицированный присадкой остатков глицерина. В уже цитированном обзоре [Rubinstein, 1979] приводится пример фракционирования гидрофобных белков нормальнофазовой хроматографией на продажном сорбенте «Lichrosorb DIOL». К диализованной против 0,1 М NaCl сыворотке тельца добавляли четыре объема пропанола. Большая часть белков при этом выпадала в осадок, а в супернатанте оставались белки, растворимые в 80%-ном пропанол. Их вносили на колонку, уравновешенную таким же раствором пропанола; им же отмывали не связавшиеся с сорбентом липофильные белки, а белки, несущие наряду с гидрофобной и достаточно хорошо выраженную гидрофильную функцию, элюировали снижающимся липейным градиентом концентрации пропанола — от 80 до 60% (рис. 101).

Для понимания механизма такого фракционирования надо вспомнить, что на поверхности белка имеется мозаика гидрофильных и гидрофобных участков, образуемых остатками соответствующих аминокислот. Поведение белка в целом определяется соотношением площадей участков, образующих эту мозаику. Фракционируемые здесь белки гидрофобны в том смысле, что они растворимы в 80%-ном растворе пропанола, но это отнюдь не означает, что их растворимость в пропанол выше, чем в воде. Таким свойством, может быть, обладают некоторые белки, которые мы выше назвали «липофильными». Те гидрофобные белки, которые фракционируются снижающимся градиентом концентрации пропанола, «предпочитают» связываться с гидрофильным сорбентом (условие протекания хроматографического процесса) и лишь понемногу выходят в водно-органическую подвижную фазу.

Приведем еще один пример использования нормальнофазовой ЖХВД, на этот раз для анализа компонентов ДНК — обнаружения в ее составе метилированных производных гуанина [Lawrence et al., 1981]. Пурины из ДНК выселяли нагреванием при 70° в те-

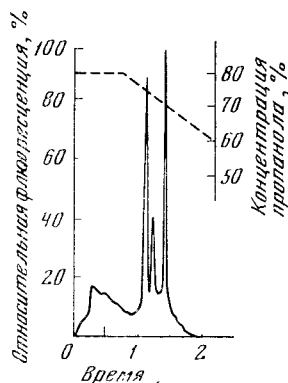


Рис. 101. Нормальнофазовая хроматография гидрофобных белков сыворотки телянка на колонке Lichrosorb DIOL» [Rubinstein, 1979]

● Сплошная линия — профиль элюции по флуоресценции, пунктир — концентрация пропанола

чением часа в кислой среде ($0,1 \text{ M H}_3\text{PO}_4$), затем раствор нейтрализовали и пропускали через маленькую колонку «Sep Pak C_{18} » ($1 \times 1,5 \text{ см}$). В этой колонке благодаря своей гидрофобности задерживались пурины и метилпурины, а все прочие примеси можно было вымыть водой. Материал, сорбированный колонкой, снимали метанолом и оставляли на ночь. Большая часть пуринов выпадала в осадок, их удаляли центрифугированием. Только теперь наступала очередь нормальнофазовой хроматографии. Оставшийся в растворе метанола материал вносили на колонку «Lichrosorb Si-60» ($0,46 \times 25 \text{ см}$), а затем элюировали смесью метанола с хлороформом (1 : 4), насыщенной водой и подкисленной $0,001\% \text{ H}_3\text{PO}_4$ (скорость элюции — 1 мл/мин). Сначала выходил О-метилгуанин (через 5 мин), потом 7-метилгуанин (7 мин), аденин (11 мин) и гуанин (17 мин).

ЛИТЕРАТУРА

- Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981.
- Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983.
- Остерман Л. А. — Успехи биол. химии., 1980, 21, с. 54–78.
- Assenza S. P., Brown P. R., Goldberg A. P. — J. Chromatogr., 1983a, 272, p. 373–375.
- Assenza S. P., Brown P. R., Goldberg A. P. — J. Chromatogr., 1983b, 272, p. 305–307.
- Best A. N., Allison D. P., Novelli G. D. — Anal. Biochem., 1981, 114, p. 235–243.
- Bennett H. P. J., Browne C. A., Solomon S. — Biochemistry, 1981, 20, p. 4530–4538.
- Bhown A. S., Mole J. E., Bennett J. C. — Anal. Biochem., 1981, 110, p. 355–359.
- Bina M., Radonovich M. F., Roe B. A. — Anal. Biochem., 1981, 114, p. 105–111.
- Black S. D., Coon M. J. — Anal. Biochem., 1982, 121, p. 281–285.
- Blume D. E., Saunders J. A. — Anal. Biochem., 1981, 114, p. 97–102.
- Brown P. R., Krstulovic A. M. — Anal. Biochem., 1979, 99, p. 1–21.
- Buck M., Connick M., Ames B. N. — Anal. Biochem., 1983, 129, p. 1–13.
- Burgess A. W., Knesel J., Sparrow L. G. et al. — Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1982, 79, p. 5753–5757.
- Campbell C., Arfin S. M., Goldman E. — Anal. Biochem., 1980, 102, p. 153–158.
- Carson S. D., Konigsberg W. H. — Anal. Biochem., 1981, 116, p. 398–401.
- Certa U., von Ehrenstein G. — Anal. Biochem., 1981, 118, p. 147–154.
- Christman J. K. — Anal. Biochem., 1982, 119, p. 38–48.
- Colantuoni V., Guarini L., Cortese R. — Anal. Biochem., 1979, 93, p. 248–250.
- Comings D. E., Miguel A. G., Lesser B. H. — Biochim. et biophys. acta, 1979, 563, p. 253–260.
- Conner B. J., Comings D. E. — J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 3283–3291.
- Day L. E., Hirst A. J., Lai E. C. et al. — Biochemistry, 1981, 20, p. 2091–2098.

- De Jong C., Hughes G. J., Van Wieringen E., Wilson K. J.—*J. Chromatogr.*, 1982, **241**, p. 345—359.
- Dizdaroğlu M., Krutzsch H. C.—*J. Chromatogr.*, 1983, **264**, p. 223—229.
- Dynan W. S., Jendrisak J. J., Hager D. A., Burgess R. R.—*J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, p. 5860—5865.
- Eshaghpour H., Crothers D. M.—*Nucl. Acids Res.*, 1978, **5**, p. 13—21.
- Fabry M., Kaldova L., Rychlik I.—*Biochim. et biophys. acta*, 1981, **652**, p. 139—150.
- Fohlman J., Rask L., Peterson P. A.—*Anal. Biochem.*, 1980, **106**, p. 22—26.
- Fullmer C. S., Wasserman R. H.—*J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, p. 7208—7242.
- Gardner W. S., Miller W. H., III.—*Anal. Biochem.*, 1980, **101**, p. 61—65.
- Gurley L. R., Valdez J. G., Prentice D. A., Spall W. D.—*Anal. Biochem.*, 1983, **129**, p. 132—144.
- Hampel A. E., Ruefer B.—*Meth. Enzymol.*, 1979, **59**, p. 218—229.
- Hancock W. S., Bishop C. A., Prestidge R. L., Hearn M. T. W.—*Anal. Biochem.*, 1978, **89**, p. 203—212.
- Hancock W. S., Bishop C. A., Hearn M. T. W.—*Anal. Biochem.*, 1979, **92**, p. 170—173.
- Hatfield G. W.—*Meth. Enzymol.*, 1979, **59**, p. 215—218.
- Hawke D., Yuan P.-M., Shively J. E.—*Anal. Biochem.*, 1982, **120**, p. 302—311.
- Hayashi T., Tsuchiya H., Naruse H.—*J. Chromatogr.*, 1983, **274**, p. 318—324.
- Heckman J. E., Alznerdeweerd B., RajBhandary U. L.—*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1979, **76**, p. 717—721.
- Heinrikson R. L., Meredith S. C.—*Anal. Biochem.*, 1984, **136**, p. 65—74.
- Henderson L. E., Copeland T. D., Oroszlan S.—*Anal. Biochem.*, 1980, **102**, p. 1—7.
- Heukeshoven J., Dernick R.—*J. Chromatogr.*, 1982, **252**, p. 241—254.
- Hillen W., Klein R. D., Wells R. D.—*Biochemistry*, 1981, **20**, p. 3748—3756.
- Hobbs D. S., Pestka S.—*J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, p. 4071—4076.
- Holmes W. M., Hurd R. E., Reid B. R. et al.—*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1975, **72**, p. 1068—1071.
- Hoppe J., Wagner K. G.—*FEBS Lett.*, 1977, **74**, p. 95—98.
- Jacobson G. R., Lee C. A., Sailer M. H.—*J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, p. 249—252.
- Kelmers A. D., Weeren H. O., Weiss J. F. et al.—*Meth. Enzymol.*, 1971, **20**, p. 9—34.
- Kerlavage A. R., Kahan L., Cooperman B. S.—*Anal. Biochem.*, 1982, **123**, p. 342—348.
- Kerlavage A. R., Hasan T., Cooperman B. S.—*J. Biol. Chem.*, 1983, **258**, p. 6313—6318.
- Koehn J. A., Canfield R. E.—*Anal. Biochem.*, 1981, **116**, p. 349—356.
- Kuo K. C., McCune R. A., Gehrke C. W. et al.—*Nucl. Acids Res.*, 1980, **8**, p. 4763—4776.
- Larson J. E., Hardies S. C., Patient R. K., Wells R. D.—*J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, p. 5535—5541.
- Lawrence J. F., Leduc R., Ryan J. J.—*Anal. Biochem.*, 1981, **116**, p. 433—438.
- Lewis R. V., Fallon A., Stein S. et al.—*Anal. Biochem.*, 1980, **104**, p. 153—159.
- Levy W. P., Rubinstein M., Shively J. et al.—*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1981, **78**, p. 6186—6190.
- L'Italiani J. J., Laursen R. A.—*J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, p. 8092—8101.
- Mahoney W. C.—*Biochim. et biophys. acta*, 1982, **704**, p. 284—289.
- Mahoney W. C., Hermodson M. A.—*J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, p. 11199—11203.
- Manchester K. L., Manchester J. E.—*FEBS Lett.*, 1980, **110**, p. 177—180.
- McFarland G. D., Borer P. N.—*Nucl. Acids Res.*, 1979, **7**, p. 1067—1080.
- McLaughlin L. W., Cramer F., Sprinzl M.—*Anal. Biochem.*, 1981, **112**, p. 60—69.
- Meek J. L.—*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1980, **77**, p. 1632—1636.
- Mischke C. F., Wickstrom E.—*Anal. Biochem.*, 1980, **105**, p. 181—187.
- Mizutani T., Narihara T.—*J. Chromatogr.*, 1982, **239**, p. 755—760.
- Morris C. J. O. R.—*J. Chromatogr.*, 1978, **159**, p. 33—46.
- Nagasawa T., Nagasawa-Fujimori H., Heinrich P. C.—*Europ. J. Biochem.*, 1979, **94**, p. 31—39.
- Nice E. C., Capp M. W., O'Hare M. J.—*J. Chromatogr.*, 1979, **185**, p. 413—427.
- Nice E. C., Capp M. W., Cooke N., O'Hare M. J.—*J. Chromatogr.*, 1981, **218**, p. 569—580.

- Nowak G., Leonwicz A., Trojanowski J.—Anal. Biochem., 1979, 94, p. 48–52.
- Owens R. A., Diener T. O.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1982, 79, p. 113–117.
- Patel V., Hellman U., Sindhuphak T., Svensson I.—J. Chromatogr., 1982, 244, p. 373–377.
- Pearson R. L., Weiss J. F., Kelmers A. D.—Biochim. et biophys. acta, 1971, 228, p. 770–774.
- Pearson J. D., Lin N. T., Regnier F. E.—Anal. Biochem., 1982, 124, p. 217–230.
- Petrides P. E., Jones R. T., Böhlen P.—Anal. Biochem., 1980, 105, p. 383–388.
- Petrović S. L., Novaković M. B., Metlaš R. M.—Anal. Biochem., 1978, 90, p. 365–373.
- Popović D. A.—Anal. Biochem., 1975, 67, p. 462–467.
- Popović D. A.—J. Chromatogr., 1982, 236, p. 234–236.
- Popovic D. A., Wintzerith M.—J. Chromatogr., 1983, 268, p. 285–290.
- Potter H., Dressler D.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1980, 77, p. 2390–2394.
- Ramos D. L., Schoffstall A. M.—J. Chromatogr., 1983, 261, p. 83–93.
- Regnier F. E., Gooding K. M.—Anal. Biochem., 1980, 103, p. 1–25.
- Reinbolt J., Hounwanou N., Boulanger Y. et al.—J. Chromatogr., 1983, 259, p. 121–130.
- Roberts A. B., Anzano M. A., Lamb L. C. et al.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1981, 78, p. 5339–5343.
- Robillard G. T., Dooijewaard G., Lokema J.—Biochemistry, 1979, 18, p. 2984–2990.
- Rose S. M., Schwartz B. D.—Anal. Biochem., 1980, 107, p. 206–213.
- Rubinstein M.—Anal. Biochem., 1979, 98, p. 1–7.
- Rubinstein M., Chen-Kiang S., Stein S., Udenfriend S.—Anal. Biochem., 1979, 95, p. 117–121.
- Shafer-Nielsen C., Rose C.—Biochim. et biophys. acta, 1982, 696, p. 323–331.
- Smart J. E., Oppermann H., Czernilofsky A. P. et al.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1981, 78, p. 6013–6017.
- Somack R.—Anal. Biochem., 1980, 104, p. 464–468.
- Sottrup-Jensen L., Petersen T. E., Magnusson S.—Anal. Biochem., 1980, 107, p. 456–460.
- Spencer M.—J. Chromatogr., 1982a, 238, p. 307–316.
- Spencer M.—J. Chromatogr., 1982b, 238, p. 317–325.
- Spencer M., Binns M. M.—J. Chromatogr., 1982, 238, p. 297–306.
- Stein S., Kenny C., Friesen H.-J. et al.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1980, 77, p. 5716–5719.
- Tapuhi Y., Schmidt D. E., Lindner W., Karger B. L.—Anal. Biochem., 1981, 115, p. 123–129.
- Tarr G. E.—Anal. Biochem., 1981, 111, p. 27–32.
- Tarr G. E., Crabb J. W.—Anal. Biochem., 1983, 131, p. 99–107.
- Usher D. A.—Nucl. Acids Res., 1979, 6, p. 2289–2306.
- Van der Rest M., Fietzek P. P.—Europ. J. Biochem., 1982, 125, p. 491–496.
- Von der Haar F.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, 70, p. 1009–1013.
- Waldron C., Cox B. S., Wills N. et al.—Nucl. Acids Res., 1981, 9, p. 3077–3081.
- Walseth T. F., Graff G., Moos M. C., Goldberg N. D.—Anal. Biochem., 1980, 107, 240–245.
- Waters L. C., Novelli G. D.—Meth. Enzymol., 1971, 20, p. 39–44.
- Wells R. D., Hardies S. C., Horn G. T. et al.—Meth. Enzymol., 1980, 65, p. 327–347.
- Wittig B., Wittig S.—FEBS Lett., 1979, 105, p. 254–258.
- Wosnick M. A., White B. N.—Biochim. et biophys. acta, 1979, 561, p. 194–205.
- Yang W.-K., Novelli G. D.—Meth. Enzymol., 1971, 20, p. 44–55.
- Yuan P.-M., Pande H., Clark B. R., Shively J. E.—Anal. Biochem., 1982, 120, p. 289–301.
- Zalut C., Harris H. W.—J. Biochem. and Biophys. Meth., 1980, 2, p. 155–161.

АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ВВОДНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

В этом виде хроматографии неподвижная фаза представлена твердой поверхностью снаружи и внутри гранул сорбента — в их порах. Для пористых сорбентов, как и в случае гидрофобной хроматографии, имеет место эффект гель-фильтрации, поскольку жидкость внутри пор неподвижна, но по сравнению с адсорбцией этот эффект невелик и мы его опять учитывать не будем. На поверхности сорбента, вообще говоря, могут сорбироваться не только молекулы фракционируемого вещества, но и молекулы элюента, которые могут даже конкурировать с веществом за одни и те же участки поверхности. Однако обычно молекулы вещества обладают намного большим сродством к сорбенту, чем элюент, и такая конкуренция играет второстепенную роль. Равновесное распределение вещества между неподвижной и подвижной фазами определяется процессами его сорбции и десорбции на поверхности сорбента, которые в немалой степени зависят от природы элюента, но не столько в плане конкуренции за «центры сорбции» на поверхности, сколько в том смысле, что от характера элюента зависит растворимость вещества в жидкости подвижной фазы.

В процессе сорбции вещества (и элюента) на поверхности сорбента могут участвовать несколько типов физических взаимодействий между молекулами. Кратко охарактеризуем важнейшие из них.

1. *Дипольные* взаимодействия возникают в результате действия электрического поля, существующего в ближайшей окрестности молекулы сорбента, или вещества, или их обоих, если по своей структуре эти молекулы представляют собой постоянные диполи (т. е. если электронная плотность выше у одного из концов молекулы). В отличие от электрического поля ионов поле, создаваемое диполем, ориентировано в пространстве.

2. *Ван-дер-Ваальсовы* (или лондоновские) дисперсионные силы притяжения действуют на очень малых расстояниях. Они возникают в результате тенденции электронов близлежащих молекул двигаться в фазе друг с другом, с тем чтобы свести к минимуму суммарную энергию взаимодействия. Эти силы были исследованы в 1930 г. Лондоном.

3. *Водородные* связи возникают в результате взаимодействия атома водорода, ковалентно связанного с электроотрицательным атомом, и другого, также электроотрицательного атома, обладающего неподеленной парой электронов. Такое взаимодействие, например, является причиной ассоциации молекул воды. Водородные

связи действуют на больших расстояниях, чем названные выше силы, и определенным образом направлены. Сила этих связей зависит от химической природы участвующих в ней молекул — от степени электрофильности атома водорода и степени нуклеофильности его партнера по водородной связи.

4. *Ионные* связи, т. е. силы электростатического притяжения между ионами, лежащими на поверхности сорбента (входящими в его структуру), и ионами вещества или элюента. Эти силы действуют также на значительных расстояниях и превосходят силы водородных связей. Возможны и комбинированные взаимодействия, например ионно-дипольные.

Для незаряженных молекул вещества доминирующий характер взаимодействия обусловлен степенью их полярности. Полярные молекулы сорбируются по механизму дипольного взаимодействия или с образованием водородных связей, а неполярные — за счет дисперсионных (лондоновских) сил.

Характер и степень связывания молекул вещества сорбентом сильно зависят от взаимодействия вещества с элюентом. В этом взаимодействии участвуют те же силы дипольного и дисперсионного характера, а также водородные связи и электростатические силы. Совокупность всех взаимодействий обуславливает степень растворимости вещества в элюенте. Склонность к адсорбции и растворимость вещества выступают как конкурирующие характеристики, соотношением которых можно управлять путем изменения состава элюента. Изменение силы и характера адсорбции вещества при этом может происходить как за счет изменения физических параметров его молекул (заряда, конформации), так и за счет изменения эффективности конкуренции молекул элюента за центры сорбции, а также в результате того, что под действием элюента могут изменяться и сорбционные свойства самого сорбента. Особо надо отметить воздействие на фактор стерического соответствия молекул вещества и сорбента, т. е. возможности совпадения расстояний между способными взаимодействовать атомами и химическими группами на поверхностях обоих партнеров, когда контакт между ними оказывается неодноточечным. Этот фактор может придавать адсорбционной хроматографии особенно высокую степень избирательности.

Среди перечисленных типов связи вещества с сорбентом не названо гидрофобное взаимодействие. Случай, когда оно играет доминирующую роль, был выделен в особый вид хроматографии, но, разумеется, силы гидрофобного взаимодействия могут участвовать и в сложной системе связей при адсорбционной хроматографии.

Таким образом, складывается разнообразный арсенал средств управления характером адсорбции. Этим арсеналом можно пользоваться избирательно, опираясь на тонкие физико-химические различия молекул веществ, входящих в состав фракционируемых смесей. К сожалению, многие из существенных для адсорбции различий между молекулами веществ бывают не всегда известны, поэтому в адсорбционной хроматографии чаще, чем в других видах хроматографии, приходится прибегать к эмпирическому подбору параметров

процесса. Следует, в частности, обратить внимание на очень распространенный случай присутствия на поверхности сорбента немногочисленных, но особо активных центров сорбции, за счет которых заметно ухудшается элюция и разрешение зон вещества. Такие центры следует по возможности блокировать до начала фракционирования препарата сорбцией на них балластного вещества (например, неактивного белка). Затем колонку промывают элюентом бо- лее высокой элюирующей силы, чем тот, что будет использован в эксперименте. Со всех «нормальных» мест сорбции балластное вещество при этом снимается, а в особо активных центрах остается. Повышение температуры элюента, как правило, облегчает десорбцию вещества, поскольку процессы сорбции обычно имеют экзотермический характер, однако на степени разрешения хроматографических зон повышение температуры нередко сказывается отрицательно из-за чрезмерного роста интенсивности продольной диффузии.

Отметим еще, что условия сорбции для макромолекул внутри пор сорбента, когда молекулы и поры соизмеримы по размерам, отличаются от таковых на поверхности гранул. В частности, внутри пор повышается вероятность многоточечного контакта макромолекулы с сорбентом, что может приводить к очень прочной, иногда необратимой сорбции части вещества и его «потерям» в ходе хроматографии.

СОРБЕНТЫ

Любая твердая поверхность является в некоторой степени сорбентом, что хорошо известно из повседневной практики по способности этих поверхностей к загрязнению. Удельная сорбционная способность (отнесенная к 1 г сорбента), как бы ее ни определять, будет, очевидно, тем выше, чем больше отношение поверхности к массе, т. е. чем мельче сами частицы (гранулы) сорбента и чем мельче пронизывающие их поры. Важными качествами сорбента, предназначенного для хроматографии, являются его полная нерастворимость в широком наборе возможных жидких элюентов и химическая инертность.

В адсорбционной хроматографии относительно малых органических молекул, для которой в качестве элюентов нередко используют органические растворители, широкое применение в качестве сорбентов находят силикагель и окись алюминия. Краткая характеристика этих материалов была дана в гл. 2. В частности, было отмечено, что их сорбционная способность зависит от количества связанной воды и может снижаться по мере того, как сорбент набирает воду. Это особенно ярко выражено в случае силикагеля (его используют как осушитель), поэтому силикагель в качестве сорбента используется только с органическими элюентами (имеется в виду, разумеется, немодифицированный силикагель). Окись алюминия в форме «Alumina C_γ» не столь гигроскопична и в виде 5—20%-ного водного золь сохраняет способность конкурентно с водой сорбировать полярные молекулы, в частности белки. Сорб-

ция нередко носит избирательный характер за счет регулярного расположения сорбирующих центров на поверхности гранул сорбента. «Alumina C_γ» используется только для сорбции из объема; для колоночной хроматографии она не пригодна ввиду исключительно низкой скорости течения жидкости через плотно упакованный слой сорбента. Для колоночной хроматографии в органических растворителях используют специальные типы кислот, нейтральной и щелочной (в зависимости от предварительной обработки) окиси алюминия.

Активированный уголь (прогретый в инертной атмосфере до 700—1000°) широко используется для очистки растворов, например буферных или солевых, от разного рода низкомолекулярных органических примесей, которые хорошо, а иногда и необратимо им сорбируются. Для адсорбционной хроматографии не только биологических макромолекул, но и их мономерных звеньев активированный уголь не применяется ввиду плохой воспроизводимости его сорбционных характеристик и значительной необратимой сорбции. Основную роль в сорбции на активированном угле играют лондонские дисперсионные силы.

Использование высокой сорбционной способности стекла (в виде гранул пористого стекла) для адсорбционной хроматографии белков, нуклеиновых кислот и их компонентов оказалось, вопреки первоначальным ожиданиям, делом малоперспективным из-за тех же трудностей, связанных с плохой воспроизводимостью и необратимостью сорбцией.

Кизельгур (целит) нашел себе применение главным образом в качестве сорбента, фиксирующего неподвижную жидкую фазу в распределительной хроматографии, например в рассмотренной выше обратнофазовой хроматографии типа ХОФ-5. Кроме того, его использовали для прочной сорбции метилированного по карбоксильным остаткам белка при создании специфического сорбента для нуклеиновых кислот. В конце 60-х годов колонки с сорбентом такого рода (МАК-колонки) были весьма популярны, но сейчас их вытеснили более совершенные варианты хроматографии НК.

Окись магния, силикаты магния (например, «Florisor»), карбонат кальция, а также полистирол и полиамиды имеют свои области применения в адсорбционной хроматографии, главным образом в неполярных растворителях, но в процессах очистки и фракционирования белков и НК они практически не используются.

Мы привели довольно длинный список широко известных адсорбентов, которые не используются в интересующих нас хроматографических методах очистки и фракционирования биополимеров, для того чтобы освободить подход к практически единственному варианту адсорбционной хроматографии, который широко и плодотворно применяется для этой цели. Речь идет о хроматографии белков и НК на оксиапатите.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОКСИАПАТИТА

Исходными материалами служат хлористый кальций и двузамещенный фосфат натрия. Приведем одну из недавних прописей приготовления оксиапатита [Pакгорра et al., 1975]. По 2 л 0,5 М водных растворов CaCl_2 и Na_2HPO_4 сливают, подавая их с одинаковой скоростью (8 л/ч) в стакан, куда помещен быстро вращающийся (~ 500 об./мин) магнит мешалки. Выпадает водонерастворимый осадок брусита $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Его обильно промывают водой (декантацией и на фильтре), а затем суспендируют в 800 мл кипящей воды, добавив в нее 80 мл концентрированного аммиака. Суспензию кипятят в двухлитровой колбе с непрерывным перемешиванием в течение 30 мин, промывают 3 раза по 2 л воды, нейтрализуют в 5 л воды разбавленной фосфорной кислотой до pH 7,1 и промывают 4 раза по 2 л 0,01 М Na-фосфатного буфера, pH 7,1 — дважды при комнатной температуре и дважды при 90° (5 и 15 мин). Затем следуют еще две промывки по 4 л того же буфера при комнатной температуре, после чего осадок сохраняют во влажном виде при 4° .

Кипячение в щелочной среде приводит к превращению брусита в оксиапатит $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. После отмывки мелких частиц и остатков щелочи фосфатным буфером получают материал (кристаллы размером около 300 мкм), обладающий описанными ниже уникальными сорбционными свойствами и вместе с тем обеспечивающий (в отличие от брусита) приемлемые скорости течения элюента через заполненную им колонку. Описаны и другие, существенно не отличающиеся от приведенного, варианты приготовления оксиапатита. Уже упоминалось, что продажные препараты в сухом виде («Bio-Gel HTP») и в виде суспензии («Bio-Gel HT») поставляются фирмой «Bio-Rad» и рядом других фирм. Там же, в гл. 2, было сказано о хрупкости кристаллов оксиапатита и о затруднениях с использованием его в колонках (самоуплотнение в ходе эксплуатации, отсюда — ухудшение течения), а также был упомянут предлагаемый фирмой «BDH» для преодоления этих затруднений сферический пористый оксиапатит, не разрушающийся при скоростях течения до $100 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$. В лабораторных условиях гранулированный оксиапатит с аналогичными характеристиками можно получить, вводя в раствор при осаждении брусита центры конденсации, которыми служат частицы силикагеля размером 15—25 мкм [Mazin et al., 1974].

СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ОКСИАПАТИТА

Оксиапатит сорбирует довольно широкий спектр биополимеров, куда входят кислые и щелочные белки, нативные двушнитевые ДНК, денатурированные однонитевые ДНК и РНК. Незаряженные макромолекулы, например полисахариды, не сорбируются, так же как аминокислоты, короткие пептиды и нуклеотиды. Нуклеиновые кислоты сорбируются прочнее, чем белки, двушнитевые ДНК — прочнее, чем однонитевые. Сорбции нуклеиновых кислот и кислых белков

эффективно препятствуют ионы фосфата и особенно пирофосфата. Фосфатные буферы различных концентраций используются для хроматографической элюции этих биополимеров с колонок оксиапатита. Замечательно, что нейтральные соли, например NaCl и KCl, в этих случаях не препятствуют сорбции и не годятся в качестве элюентов. Сульфаты, оксалаты и карбонаты также малоэффективны.

Иная картина обнаруживается при сорбции щелочных белков. Ионы фосфата способствуют их сорбции, а NaCl и KCl в достаточной концентрации вытесняют щелочные белки с оксиапатита. Можно думать, что в двух столь различных ситуациях доминируют разные механизмы взаимодействия биополимеров с сорбентом. Рассмотрим несколько подробнее экспериментальные данные, относящиеся к этим механизмам.

СОРБЦИЯ БЕЛКОВ

Сорбцию белков на оксиапатите исследовали Бернарди и соавторы [Bernardi, Kawasaki, 1968; Bernardi, 1971a]. Было установлено, что в случае кислых белков доминирующую роль в сорбции играют остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот. Из целого ряда синтезированных полиаминокислот только полиаспарагиновая и полиглутаминовая задерживались оксиапатитом. Для серии сополимеров глутаминовой кислоты с гистидином, лизином, фенилаланином и серином прочность сорбции оказалась пропорциональной содержанию глутаминовой кислоты. Было сделано предположение, что сорбция кислых белков определяется в первую очередь кулоновским взаимодействием их карбоксильных групп с однократно положительно заряженными ионами (Ca^{+}) на поверхности оксиапатита. Анионы фосфорной кислоты конкурируют с карбоксилатами за взаимодействие с этими ионами. Здесь надо дать объяснение эффективности в этом плане именно анионов фосфорной кислоты по сравнению, например, с ионами Cl^{-} . Вероятно, дело не только в том, что анионы фосфата несут двойной, а при обычных для элюции нейтральных значений pH — частично и тройной по сравнению с Cl^{-} отрицательный заряд, поскольку соответственное увеличение концентрации NaCl не дает сопоставимого эффекта. Кроме того, анионы фосфата, как указывалось, явно более эффективно элюируют кислые белки, чем анионы сульфата.¹ Возможно, что объяснение особой эффективности анионов фосфата в качестве элюентов с оксиапатита (что проявляется и при элюции НК) следует искать в пространственном соответствии расстояний между несущими заряд атомами кислорода фосфорной кислоты и между ионами кальция на поверхности оксиапатита. Присоединение аниона фосфата к соседнему по отношению к точке связывания белка иону кальция создает в непосредственной близости от этой точки как бы высокую эффективную концентрацию конкурирующего агента — второй заряженный кислород фосфата «ожидает» возможности заместить кислород карбоксилата белка, связанного с ионом кальция, как только эта связь несколько ослабнет в результате тепловых ко-

лебаний молекулы белка. Предполагать такое же пространственное соответствие для аниона сульфата не приходится, а в случае одновалентных анионов ничего подобного вообще не может произойти.

Далее Бернади и Кавасаки показали, что денатурированные белки (в присутствии 8 М мочевины) связываются с оксиапатитом явно слабее, чем нативные. Это легко понять, если вспомнить, что в нативной конфигурации у цитоплазматических белков гидрофильные остатки аминокислот, в том числе Asp и Glu, экспонированы снаружи белковой глобулы. В статистическом клубке денатурированного белка их относительное представительство на поверхности уменьшается. В предложенную трактовку механизма связывания кислых белков легко укладывается и известный факт более прочной сорбции на оксиапатите фосфопротеидов (например, фосфитин элюируется только 1,2 М К-фосфатным буфером, в то время как для обычных кислых белков, даже крупных, оказывается достаточным 0,2—0,4 М фосфата). Представляет интерес замеченная авторами необходимость увеличения концентрации элюирующего фосфатного буфера для снятия с колонки оксиапатита кислых белков при увеличении длины колонки. Данное явление лучше выражено для относительно небольших белков. Его можно связать с вероятностью прочного многоточечного связывания белков с оксиапатитом. Уже десорбированный белок при своем движении по длинной колонке имеет больше шансов «найти» такой участок поверхности сорбента, где он сможет связаться в большем числе точек, чем он был связан первоначально, до своей десорбции. Чем крупнее белок, т. е. чем в большем числе точек он связывается изначально, тем меньше вероятность существенных вариаций характера этого связывания в ходе элюции. Естественно (и это подтверждает эксперимент), что крупные белки того же аминокислотного состава с одной и той же колонки элюируются труднее, чем мелкие. Кстати, из наблюдения авторов следует практический вывод о том, что в случае фракционирования белков (и НК) на оксиапатите не следует увеличивать длину колонки сверх того, что необходимо для разделения интересующих исследователя компонентов смеси макромолекул.

Хроматографию на оксиапатите чаще используют не для фракционирования, а для очистки одного из компонентов смеси, заведомо отличающегося по прочности сорбции от остальных. В этом случае тем более нет смысла удлинять колонку. Любопытно отметить, что необходимая молярность элюирующего фосфатного буфера снижается при увеличении загрузки колонки. По-видимому, конкурируя за точки сорбции, молекулы белков мешают друг другу, не давая занять положение максимально прочной многоточечной сорбции.

Все сказанное выше еще в значительной степени относится к области предположений, многое в механизме сорбции кислых белков на оксиапатите остается неясным. Механизм этот явно сложнее, чем было здесь описано. В частности, можно не сомневаться, что, кроме

кулоновских, в нем участвуют и другие силы взаимодействия. Об этом говорит, например, тот факт, что сорбционная способность оксиапатита очень сильно зависит от способа его приготовления и порой не воспроизводится даже при использовании одного и того же способа (то же относится к разным партиям продажного сорбента). Поскольку сорбция идет на поверхности кристаллов оксиапатита, такую нестабильность следует отнести к вариациям кристаллической структуры. Это характерно не для кулоновских взаимодействий с их относительным дальним действием и изотропностью, а, например, для направленных и локальных дипольных взаимодействий.

Ограниченность наших представлений о механизме сорбции кислых белков на оксиапатите с еще большим основанием следует отнести к механизму сорбции основных белков. Вероятно, в ней участвуют кулоновские взаимодействия положительно заряженных остатков аминокислот на поверхности белка с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты, которые тоже должны быть на поверхности оксиапатита. Об этом говорит более прочная сорбция полилизина и полиаргинина, чем других, более нейтральных полипептидов. Но вполне возможно, что и иные виды взаимодействия здесь играют важную роль. Элюцию основных белков с оксиапатита удастся осуществить как фосфатным буфером, так и солевым раствором. Приписать роль элюента только щелочному металлу трудно, поскольку лизоцим, например, элюируется 0,12 М К-фосфатным буфером, но лишь 0,25 М KCl. Между тем CaCl_2 элюирует основные белки при концентрации, на порядок меньшей, чем KCl или NaCl. Кстати, вернувшись к кислым белкам, отметим, что кислая ДНК-аза змеиного яда ($pI = 5,9$), панкреатическая ДНК-аза ($pI = 4,7$) и миоглобин ($pI = 7$), хотя и с трудом но элюируются с оксиапатита достаточно концентрированными растворами KCl (соответственно 0,54; 0,4 и 0,8 М), но не снимаются с него даже 3 М раствором CaCl_2 . Бернарди предполагает, что Ca^{2+} в этом случае может участвовать в образовании связующих мостиков между карбоксилатами белков и фосфатами оксиапатита [Bernardi, 1973].

Резюмируя, можно сказать, что хроматографическое фракционирование и очистка белков на оксиапатите остаются пока методами эмпирическими, где предсказать результаты и дать заранее определенные рекомендации по выбору оптимальных условий элюции затруднительно.

Колонки оксиапатита обычно предварительно промывают 5—10 объемами слабого ($\leq 0,05$ М) нейтрального фосфатного буфера. Если стабильность белка требует определенной ионной силы, ее обеспечивают добавлением в буфер для промывки и элюент соли. Элюцию кислых белков ведут ступенчатым или линейным градиентом концентрации фосфатного буфера — вплоть до 0,8 М. Особо прочно сорбированные белки нередко снимают пирофосфатом. Емкость колонки оксиапатита обычно составляет примерно 1—5 мг белка на 1 мл объема колонки, выход белков — 80—100%. Утрата ферментативной активности наблюдается редко — метод относительно «мягок». По-видимому, механизм сорбции (в частности,

кулоновское взаимодействие — благодаря своему дальнему действию) не связан с действием на белковую глобулу больших деформирующих сил.

Ниже будет приведено достаточное число примеров хроматографии как кислых, так и щелочных белков на колонках оксиапатита, но прежде — в интересах сопоставления — нам представляется целесообразным нарисовать столь же общую картину хроматографического поведения нуклеиновых кислот при их взаимодействии с этим сорбентом.

СОРБЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Механизм сорбции нуклеиновых кислот и их производных на оксиапатите, по-видимому, во многом аналогичен механизму сорбции кислых белков. Вместо карбоксилатов во взаимодействии с ионами кальция на поверхности сорбента участвуют остатки фосфатов полинуклеотидной цепи. Для моно- и олигонуклеотидов наблюдается явная зависимость силы сорбции от длины цепи (из-за многоточечной сорбции). Мононуклеотиды в присутствии 1 мМ фосфатного буфера задерживаются на сорбенте слабо, а основания и нуклеозиды не задерживаются вовсе. Ди- и тринуклеотиды сорбируются гораздо прочнее; решающую роль играют здесь фосфаты. Любопытно, что сказывается не только их число, но и расположение. Например, нуклеозидтрифосфаты сорбируются заметно прочнее, чем тринуклеотиды. Небольшие олигонуклеотиды хорошо сорбируются в 1 мМ фосфатном буфере, но относительно легко элюируются (0,02—0,03 М фосфатным буфером). Сорбция самих нуклеиновых кислот гораздо более прочная. Элюцию осуществляет фосфатный буфер с концентрацией 0,12—0,25 М. Размер высокомолекулярной нуклеиновой кислоты сказывается мало. По-видимому, достаточно отдаленные участки длинной цепи полинуклеотида благодаря их гибкости элюируются одновременно и независимо друг от друга.

Самой замечательной особенностью сорбции нуклеиновых кислот на оксиапатите является резко различное поведение нативных двунитевых молекул ДНК (или РНК) и одонитевых молекул денатурированных ДНК и РНК. Одонитевые молекулы снимаются с оксиапатита элюцией 0,12—0,15 М фосфатным буфером, тогда как для элюции двунитевых молекул концентрацию фосфатного буфера приходится увеличивать до 0,2—0,25 М. Можно предположить, что решающую роль здесь играет относительная жесткость линейной конформации двунитевых молекул. Сопоставим мысленно условия десорбции относительно коротких фрагментов нативной и денатурированной ДНК, связанных по длине фрагмента с оксиапатитом, например в трех точках. Вытеснение элюентом из связи с оксиапатитом гибкой одонитевой ДНК в одной из таких точек может повлечь за собой (в результате тепловых деформаций гибкой нпти) удаление прежде участвовавшего в этой связи фосфата ДНК от фиксированного на поверхности сорбента иона кальция. Затем может последовать поочередный разрыв и двух других связей — фраг-

мент освободится. Другое дело — жесткий фрагмент двунитевой ДНК. В силу его жесткости вытесненный из связи фосфат ДНК останется вблизи своего партнера на поверхности оксиапатита. Прежде чем разорвутся удерживающие фрагмент две другие связи, этот фосфат ДНК может в силу конкурентного характера замещения фосфатом элюента восстановить связь с ионом кальция и, в свою очередь, принять участие в удержании всего фрагмента в области связывания. Очевидно, что этому может помешать сокращение среднего интервала времени между разрывами соседних связей, для чего необходимо увеличить концентрацию анионов фосфата в элюенте, т. е. молярность элюирующего буфера.

Разумеется, без достаточных экспериментальных подтверждений мы не можем настаивать на таком объяснении, однако это и не так уже существенно. Важен надежно установленный экспериментальный факт: для элюции нативной ДНК (или двунитевой РНК, а также гибридных молекул ДНК—РНК) с оксиапатита требуется почти вдвое более высокая концентрация фосфатного буфера, чем для элюции денатурированной ДНК или одонитевой РНК. Это обстоятельство открыло возможность быстрого и надежного отделения двунитевых молекул нуклеиновых кислот от одонитевых, что сыграло очень важную роль как в изучении структуры генома (исследования кинетики ренатурации), так и в развитии современных методов геной инженерии (гибридизация молекул НК и др.). Как и в случае кислых белков, присутствие даже относительно высоких концентраций неорганических солей в элюирующем буфере практически не сказывается на процессах элюции одно- и двунитевых молекул НК с оксиапатита. Вместе с тем, варьируя концентрацию NaCl или KCl в буфере, можно управлять изменением конформации самих нуклеиновых кислот, а также характером их гибридизации (например, отделять «истинные», полноценные, гибридные молекулы от «несовершенных гибридов»).

Примеры использования оксиапатита для разделения одно- и двунитевых молекул нуклеиновых кислот и соответствующие практические рекомендации будут приведены в следующих разделах. Общее рассмотрение сорбции НК на оксиапатите закончим указанием на то, что на 1 мл упакованного оксиапатита можно сорбировать 0,2—0,5 мг ДНК, однако для целей фракционирования не следует превышать первой из этих цифр. Присутствие ЭДТА и цитрата препятствует сорбции, по-видимому, за счет блокирования кальция на поверхности сорбента. Следует упомянуть о том, что в аналитических опытах при избытке сорбента не только элюцию, но и исходную сорбцию НК на оксиапатите следует производить достаточно медленно, например в течение 30 мин, с тем чтобы дать возможность молекулам ДНК или РНК «отыскать» наиболее благоприятное для сорбции расположение на поверхности сорбента.

Здесь уместно упомянуть об одном эффективном методе отделения ДНК от элюирующего фосфатного буфера. Такое отделение бывает необходимо в тех нередких случаях, когда ДНК предполагается далее обрабатывать ферментами, которые фосфат ингибирует.

Осаждение этанолом в этом случае неприменимо, так как этанол осаждает и фосфат, а диализ обычно занимает 1—2 сут. Оказалось, что ДНК можно быстро осадить на холоду из раствора в фосфатном буфере добавлением детергента — цетилпиридинбромид (продажный препарат). Осаждение идет практически со 100%-ным выходом даже из растворов столь малой концентрации, как 0,01 мкг/мл. Следы фосфата из осадка вымывают водой, а детергент удаляют промывкой этанолом, в котором он очень хорошо растворим [Geck, Nász, 1983].

В заключение следует сделать одно замечание. Из изложенного явствует, что кулоновское притяжение ионов играет основную роль в сорбции биополимеров на оксиапатите. Почему же мы в таком случае не относим хроматографию на оксиапатите к категории ионообменной? Помимо бесспорного участия иных сорбционных сил, отличие хроматографии на оксиапатите от истинно ионообменной состоит еще в том, что на оксиапатите нет ионогенных групп одного определенного знака, нейтрализуемых соответственно заряженными катионами. Упорядоченная мозаика разнозаряженных ионов на поверхности одного сорбента придает оксиапатиту своеобразие, обуславливающее механизм фракционирования, сильно отличающийся от ионообменной хроматографии.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОМАТОГРАФИИ НА ОКСИАПАТИТЕ

Из общих рекомендаций, относящихся к хроматографии на оксиапатите как белков, так и НК, отметим предпочтительность использования для очистки биополимеров широких и коротких колонок. Это связано, в частности, с невысокими гидродинамическими характеристиками сорбента. Колонки с оксиапатитом отличаются относительно медленным течением элюента и довольно легко «забиваются» при измельчении его хрупких кристаллов. С другой стороны, они обнаруживают склонность к образованию каналов для элюента, поэтому иногда имеет смысл осторожно (чтобы не разрушить кристаллы) перемешивать сорбент, что трудно сделать в узкой и длинной колонке. Верхний слой оксиапатита особенно легко засоряется — его нужно время от времени удалять.

Все эти манипуляции облегчаются благодаря тому, что оксиапатит не боится контакта с воздухом и даже кратковременного обсыхания колонки. Вместе с тем колонки оксиапатита используют обычно однократно или небольшое число раз ввиду накопления необратимо сорбируемого материала. При расчете необходимого количества сорбента можно исходить из того, что 1 г сухого оксиапатита дает примерно 2,5 мл упакованного объема влажного сорбента в колонке. Температуру фракционирования выбирают, главным образом исходя из ее влияния на конформацию биополимера (особенно в случае гибридных НК). Впрочем, иногда изменения температуры используют и для фракционирования: с повышением тем-

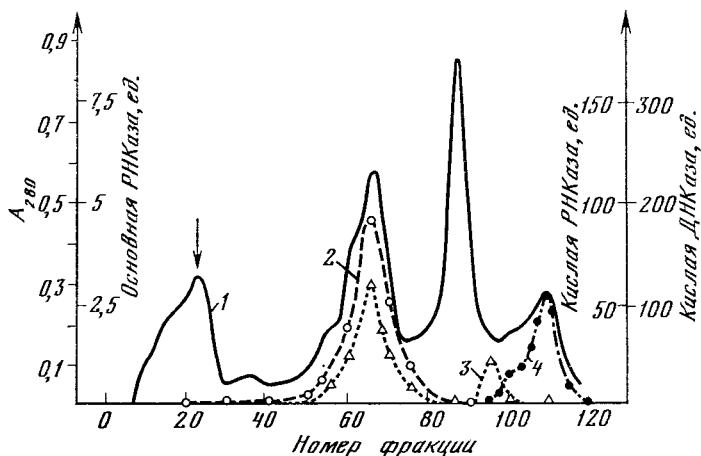


Рис. 102. Фракционирование трех нуклеаз селезенки на колонке оксиапатита (2×40 см); элюция линейным градиентом концентрации фосфатного буфера pH 6,8 (от стрелки) [Bernardi et al., 1966]

1 — УФ-поглощение при 280 нм; 2 — кислая РНКаза; 3 — основная РНКаза; 4 — кислая ДНКаза

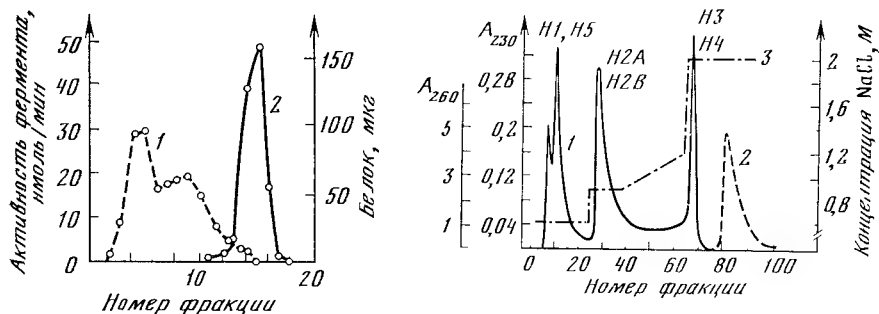


Рис. 103. Очистка кислой фосфатазы из *Drosophila* на колонке оксиапатита [Feigen et al., 1980]

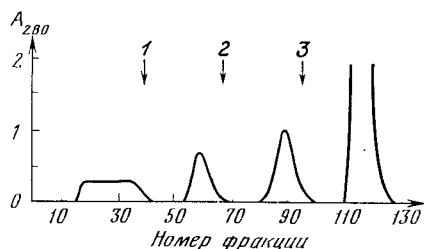
1 — содержание белка; 2 — активность фермента

Рис. 104. Фракционирование гистонов из ядер эритроцитов цыпленка на колонке оксиапатита [Simon, Felsenfeld, 1979]

1 — A_{230} ; 2 — A_{260} ; 3 — содержание NaCl

Рис. 105. Фракционирование негистоновых белков хроматина из ядер печени мыши на колонке оксиапатита в присутствии 2 М NaCl и 5 М мочевины [MacGillivray et al., 1975]

Элюция ступенчатым градиентом концентрации Na-фосфатного буфера: 1 — 0,05 М; 2 — 0,2 М; 3 — 0,5 М



пературы равновесие сдвигается в пользу десорбции. Следует иметь в виду, что при работе на холоду концентрацию фосфата натрия нельзя увеличивать выше 0,5 М, так как этой концентрацией ограничивается его растворимость при 4°. Набивку колонки производят, как обычно, заливая в нее полужидкую кашицу суспензии оксиапатита в исходном буфере, после чего уравнивают пропусканием 5—10 объемов колонки того же буфера с рабочей скоростью элюции (до 20 мл/см²·ч). Из общих свойств оксиапатита отметим еще то, что он легко растворим в 25%-ном водном растворе ТХУ. Этим можно воспользоваться для извлечения особенно прочно сорбированного вещества, например разветвленной сети ренатурированной ДНК с большим числом повторов, которую не снимает даже 0,5 М фосфатный буфер при температуре 60° [Kiper, 1978]. Рассмотрим теперь несколько примеров фракционирования и очистки белков и НК на колонках оксиапатита.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКОВ

Еще в 1966 г. Бернарди и соавторы [Bernardi et al., 1966] продемонстрировали возможность использования хроматографии на оксиапатите для очистки ферментов на примере разделения различных нуклеаз селезенки (рис. 102). Элюцию вели линейным градиентом концентрации фосфатного буфера (0,05—0,5 М), рН 6,8.

В 1971 г. в сборнике «Methods in Enzymology» была опубликована серия статей, посвященных методам очистки и фракционирования факторов инициации, элонгации и терминации белкового синтеза. В них описано использование для этих целей оксиапатита — как в варианте ступенчатой элюции с колонки, так и в объеме. Диапазон элюирующих концентраций фосфатного буфера составлял 0,03—0,3 М [Dubnoff, Maitra, 1971; Parmeggiani et al., 1971; Moldave et al., 1971; Caskey et al., 1971].

Эффективность очистки фермента данным методом более убедительно демонстрирует следующий пример, взятый из недавней публикации [Feigen et al., 1980]. В ней описывается очистка кислой фосфатазы I из *Drosophila melanogaster*. После фракционирования клеточного гомогената осаждением сульфатом аммония и первого этапа очистки на фосфоцеллюлозе фракции, отобранные по ферментативной активности, вносили на колонку оксиапатита (2,5 × 100 см), уравновешенную 0,05 М К-фосфатным буфером, рН 6,8. Использовали продажный высушенный порошок оксиапатита марки «НТР» (фирма «Bio-Rad»). Перед загрузкой в колонку ему в течение 5 мин давали набухнуть в кипящей воде. Элюцию вели линейным градиентом концентрации (0,05—0,6 М) К-фосфатного буфера, рН 6,8 (150 мл). Как видно из рис. 103, фермент сорбируется на оксиапатите прочнее, чем подавляющее большинство прочих белков, вышедших вместе с ним с колонки фосфоцеллюлозы, и благодаря этому весьма существенно очищается.

Для очистки мембранной *D*-лактатдегидрогеназы *E. coli* хроматографией на оксиапатите [Pratt et al., 1979] был использован пологий линейный градиент концентрации (0—0,2 М) К-фосфатного буфера, рН 7,2 (500 мл для колонки размером $2,6 \times 20$ см). Растворимость белка обеспечивали включением в состав буфера детергентов (1% Тритона X-100 и 0,1% ДДС-Na). Очистке на оксиапатите предшествовали освобождение фермента из мембран с помощью дезоксихолата натрия, хроматография на DE-52 и гель-фильтрация на сефадексе G-200. На всех хроматографических этапах очистки в составе элюентов тоже присутствовали детергенты.

Адсорбционная хроматография на оксиапатите фигурирует в качестве одного из этапов при выделении многих рестриктаз. Например, при препаративной очистке рестриктазы *Eco* R1 — это предпоследний этап (после фракционирования осаждением стрептомицинульфатом и сульфатом аммония и хроматографии на фосфоцеллюлозе). Широкую и короткую колонку (5,6 $\times$ 19,5 см; V_t — 480 мл) оксиапатита уравнивали 0,02 М К-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 0,2 М KCl, 5 мМ β -меркаптоэтанола и 10% глицерина. 5,6 л элюата с препаративной колонки фосфоцеллюлозы относительно медленно (0,2 л/ч) подавали на колонку. Несорбированные белки отмывали 0,5 л 0,15 М К-фосфатного буфера, рН 7,4, а затем вели элюцию линейным градиентом концентрации (0,15—0,85 М) того же буфера (4,8 л со скоростью 0,14 л/ч). Ферментативная активность элюировалась вблизи концентрации 0,44 М. Сравнительно высокая концентрация элюирующего буфера и заметный сдвиг рН в щелочную сторону указывают на менее кислый, чем в предыдущем случае, характер белка. На этом этапе он очищался более чем в 10 раз [Rubin, Modrich, 1980].

Еще более четко основной характер белка проявляется в случае ДНК-лигазы. В процессе ее очистки колонку оксиапатита использовали на заключительном этапе. Сорбент уравнивали 0,1 М KCl, а элюцию вели линейным градиентом концентрации (0—12,5%) сульфата аммония [Graf, 1979].

Связь гистонов с оксиапатитом имеет, очевидно, катионный характер, что позволяет фракционировать их (и одновременно диссоциировать от ДНК) при ступенчато увеличивающейся концентрации NaCl. В 0,1 М фосфатном буфере ДНК остается связанной с оксиапатитом даже при элюции 2 М NaCl. Так, Саймон и Фелзенфельд извлекали хроматин из ядер эритроцитов цыпленка 0,001 М Трис-буфером, рН 8, дробили его в гомогенизаторе типа «Virtis» и диализовали в течение ночи против 0,63 М NaCl в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 6,7) при 4°. Во время диализа нуклеопротеиды сначала выпадали в осадок, а затем снова растворялись по мере повышения концентрации NaCl в диализном мешочке. После осветления хроматин (34 мг по ДНК при концентрации ~ 1 мг/мл) вносили на колонку оксиапатита ($2,5 \times 20$ см), уравновешенную тем же буфером и солевым раствором на холоду. Промывка 400 мл того же раствора снимала гистоны H1 и H5, слабее других сорбирующиеся на оксиапатите (рис. 104). Следующая ступень элюции —

0,93 М NaCl в том же буфере (350 мл) — выводила из колонки гистоны H2A и H2B. Затем концентрацию NaCl линейно увеличивали до 1,2 М (500 мл). Это подготавливало быструю элюцию гистонов H3 и H4 в виде острого пика при увеличении концентрации NaCl ступенью до 2 М. ДНК все это время прочно удерживалась на оксиапатите. Ее можно было снять, увеличив концентрацию К-фосфатного буфера до 0,5 М. NaCl при этом в элюент не вносили, чтобы избежать выпадения на холоду в осадок фосфата натрия [Simon, Felsenfeld, 1979]. В данной работе стремились к очистке гистонов H2A—H2B и H3—H4, поэтому гистоны H1 и H5 снимали одновременно в 0,63 М NaCl. Можно подобрать условия и для их поочередной элюции.

2 М NaCl при малой концентрации фосфата снимает с оксиапатита гистоны, тогда как негистоновые белки хроматина (НБХ) остаются сорбированными. Эти белки носят заметно более кислый характер, поэтому для их десорбции с оксиапатита, помимо присутствия 2 М NaCl, необходимо увеличение концентрации фосфатного буфера. Например, хроматин, извлеченный из ядер печени мыши (до 20 мг по ДНК), растворяли в 0,001 М Na-фосфатном буфере, содержащем 2 М NaCl и 5 М мочевины, дробили ультразвуком и вносили на колонку оксиапатита ($1,6 \times 25$ см), уравновешенную тем же раствором. Элюцию вели со скоростью 10—12 мл/ч. Гистоны в 2 М NaCl не сорбируются на оксиапатите и выходят сразу (рис. 105). Ступенчатым повышением концентрации фосфатного буфера до 0,05 М можно снять с колонки основную массу НБХ. В небольшой пропорции к белку (~4% по массе) здесь уже начинает элюироваться и РНК. Следующая ступень (0,2 М Na-фосфат) снимает остальные НБХ, еще более кислые, и среди них — фосфорилированные. Одновременно выходит основная масса РНК. Последняя ступень элюции (0,5 М буфер) выводит из колонки ДНК, РНК и остатки белка. Общий выход белков хроматина составил около 80% [MacGillivray et al., 1975].

В работе, посвященной очистке и анализу НБХ из хроматина печени и эпидермиса, их сначала вместе с гистонами диссоциировали от ДНК (3 М NaCl и 7 М мочевины в Трис-буфере с добавлением ингибитора протеаз — апротинина), нуклеиновые кислоты удаляли центрифугированием в градиенте плотности раствора CsCl и лишь затем смесь белков сорбировали на колонку оксиапатита в 0,001 М Na-фосфатном буфере с 5 М мочевиной и апротинином (в отсутствие соли). После этого гистоны снимали 2 М NaCl, а НБХ элюировали увеличением концентрации буфера до 0,2 М с одновременной заменой 2 М NaCl на 2 М раствор гуанидинхлорида. Такая замена имеет своей целью, по-видимому, полностью освободить из остаточных комплексов особо прочно связанные с ДНК белки, поскольку далее следует их отбор из общей массы НБХ афинной сорбцией на ДНК-сефарозе [Winter et al., 1980].

В одной из недавних работ [Caiafa et al., 1981] белки хроматина после частичного гидролиза микрококковой нуклеазой сорбировали на оксиапатите (в объеме) в 0,001 М К-фосфатном буфере (pH 7,2),

а затем последовательно элюировали также в объеме 0,08 М К-фосфатным буфером, 3 М раствором NaCl в том же буфере и раствором, содержащим 3 М NaCl, 4 М гуанидинхлорид и 5 М мочевины. В последнем элюате гистоны уже отсутствовали. Фрагменты ДНК, оставшиеся на оксиапатите после удаления всех белков, элюировали 1 М Na_2HPO_4 . Если ДНК с помощью 1 М Na_2HPO_4 элюировали после второй из упомянутых промывок оксиапатита, то она выходила в комплексе с прочно связанными с ней НБХ. Интересно, что аминокислотный состав этих НБХ необычен для основной их массы: остатки кислых аминокислот преобладают над остатками основных. Значит, прочная связь этой фракции НБХ с ДНК носит неионный характер (поэтому их не снимает 3 М NaCl). Предполагалось, что такие белки связаны в малой канавке ДНК, свободной от гистонов. Число их невелико — электрофорез выявляет шесть главных белков с молекулярными массами 22, 28, 32, 56, 66 и 71 тыс. Дальтон.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Описанию различных аспектов хроматографии НК на оксиапатите посвящена большая обзорная статья [Bernardi, 1971b]. Автор отмечает, что физико-химические и биологические свойства нативной ДНК в ходе хроматографии не изменяются. При градиентной элюции ДНК обычно выходит одним пиком при концентрации К-фосфатного буфера 0,2—0,22 М. Молекулярная масса ДНК в диапазоне 10^5 — $6 \cdot 10^6$ Дальтон практически не влияет на характер элюции. Глюкозилированная ДНК четных фагов сорбируется на оксиапатите прочнее, чем неглюкозилированная. Ее элюирует 0,29 М К-фосфатный буфер, что было использовано для отделения ДНК четных фагов *E.coli* от ДНК хозяина [Oishi, 1971].

ДНК, денатурированная нагреванием (100° в течение 15 мин в 0,13 М растворе NaCl в 0,01 М К-фосфатном буфере) с последующим быстрым охлаждением, элюируется главным образом в диапазоне концентраций буфера 0,12—0,14 М, однако за ней нередко следует «псевдонативная» фракция (элюция 0,2—0,22 М фосфатным буфером). Чаще всего это — сателлитная, очень быстро ренатурирующая ДНК или фракции ДНК, обогащенные обращенными повторяющимися нуклеотидными последовательностями («палиндромами»). Обработка ДНК формальдегидом заметно уменьшает долю этой фракции и снижает необходимую для элюции денатурированной ДНК концентрацию фосфатного буфера.

Располагая колонкой с термостатируемой рубашкой и опираясь на различие прочности сорбции нативной и денатурированной ДНК на оксиапатите, можно фракционировать фрагментированную ДНК по склонности к денатурации, например по ГЦ-составу. Для этого пропускают через колонку фосфатный буфер в концентрации, способной вымывать денатурированную ДНК, заведомо не снимая нативную (например, 0,08 М), и ступенями повышают температуру

воды в рубашке от 70 до 100°. Фрагменты ДНК элюируются в порядке возрастания их устойчивости к тепловой денатурации.

Однонитевая РНК элюируется с колонки оксиапатита одним пиком при концентрации К-фосфатного буфера примерно 0,15 М, а двунитевая РНК, подобно нативной ДНК, — при концентрации 0,2—0,22 М. Что касается тРНК, то при малом разведении она выходит одним пиком, но в пологом линейном градиенте концентрации фосфатного буфера (0,1—0,2 М; 2 л для колонки 2×68 см) удается разделять индивидуальные и даже изоакцепторные тРНК, очевидно, по процентному содержанию в них двунитевых участков. Удастся фракционировать таким образом и аминоксил-тРНК; при этом рН буфера следует снизить до 5,4—5,8 во избежание деацилирования. Олигонуклеотиды Т1-гидролизата РНК в еще более пологом градиенте концентрации К-фосфатного буфера (0,01—0,2 М; 4 л для колонки $2,2 \times 45$ см) в присутствии 7 М мочевины дают сложную, но хорошо воспроизводимую картину фракционирования.

Фокс и соавторы исследовали зависимость прочности сорбции на оксиапатите нативной и денатурированной ДНК от температуры сорбента и концентрации элюирующего фосфатного буфера. В случае фрагментированной ДНК из плаценты длиной около 500 пар оснований авторы регистрировали различие в прочности сорбции правельных двунитевых структур с температурой плавления 84° и несовершенных структур с неточным спариванием нитей, температура плавления которых составляла соответственно 77° и 70°. На рис. 106 результаты этого исследования представлены в виде диаграммы. Под нижней кривой лежит область связывания с оксиапатитом как нативной, так и денатурированной ДНК. Выше верхней кривой располагается область элюции нативной ДНК. Между кривыми заключена область значений концентраций фосфатного буфера и температур, в которой на оксиапатите удерживается нативная ДНК, а денатурированная элюируется. Пунктиром и точками обозначены верхние границы этой области для случаев несовершенного спаривания нитей ДНК. Показанные на диаграмме границы областей не являются линиями истинно фазовых переходов; на самом деле эти границы имеют диффузный характер. Здесь они обозначают соотношение параметров, при котором за определенное время элюируется 50% ДНК соответствующего типа. Положение границ зависит от нуклеотидного состава ДНК, последовательности нуклеотидов и партии оксиапатита — их следует рассматривать как ориентировочные. Тем не менее небезынтересно отметить различие ха-

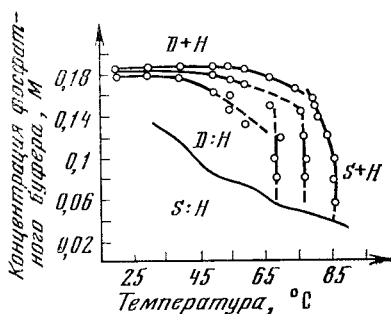


Рис. 106. Диаграмма связывания двунитевой (D) и однонитевой (S) ДНК с оксиапатитом (H) в зависимости от концентрации фосфатного буфера и температуры (связывание обозначено знаком двоеточия) [Fox et al., 1980]

ракторов нижней и верхней границ области. Элюция денатурированной ДНК (нижняя линия на рис. 101) облегчается с ростом температуры — постепенно снижается концентрация элюирующего буфера. Граница элюции нативной ДНК, напротив, остается почти неизменной вплоть до температур, близких к температуре ее плавления. Чем менее совершенно спаривание нитей ДНК, тем сильнее отклонение от этой неизменности — поведение не вполне комплементарно спаренных нитей ДНК приближается по характеру температурной зависимости к поведению однонитевой ДНК [Fox et al., 1980].

В соответствии с различным содержанием двунитевых участков с колонки оксиапатита при постепенном увеличении концентрации фосфатного буфера последовательно элюируются следующие виды НК: однонитевые ДНК и РНК, тРНК, 5S РНК, гибриды РНК—ДНК и двунитевая ДНК. Это позволило Доктору и соавторам с помощью гибридизации выделить фрагменты ДНК *E. coli* с цистронами, кодирующими тРНК и 5S РНК [Doctor et al., 1974].

Наличие некоторых примесей или специально добавленных реагентов может существенным образом изменять характер элюции НК с оксиапатита. Например, присутствие ионов ртути и особенно серебра в комплексе с ДНК существенно затрудняет элюцию однонитевой ДНК. Эти ионы нередко используют при фракционировании ДНК ультрацентрифугированием в градиенте концентрации Cs_2SO_4 [Остерман, 1981]. Если такая операция предшествовала очистке ДНК на оксиапатите, то следует принять специальные меры для удаления этих ионов [Markova et al., 1978].

Краситель «Phenyl Neutral Red» («PNR») интеркалирует в молекулы ДНК, причем преимущественно в ГЦ-богатые участки. Оказалось, что такая интеркаляция заметным образом уменьшает силу сорбции двунитевой ДНК на оксиапатите. Этим обстоятельством воспользовались Пакроппа и Мюллер для фракционирования ДНК по ГЦ-составу. Колонку оксиапатита уравнивали 40 мкМ раствором красителя ($A_{548} = 2,6$) и вносили на нее ДНК, предварительно смешанную с тем же красителем в следующей пропорции: одна молекула красителя на 8 пар оснований ДНК. Хроматографию вели градиентом концентрации (0,1—0,4 М) Na-фосфатного буфера с крутизной 1,15 мМ/мл. Двунитевая ДНК элюировалась с колонки в порядке убывания степени связывания красителя, т. е. в порядке снижения относительного содержания ГЦ-пар. Таким образом, например, легко разделились ДНК из *Micrococcus luteus*, *E. coli* и *Clostridium perfringens* (соответственно 72, 50 и 29% Г + Ц). Удалось даже отделить сателлитную ДНК тимуса от основной массы его ДНК [Pakroppa, Müller, 1974].

Для интеркаляции со сходным эффектом можно воспользоваться и более привычным красителем — бромистым этидием, в частности для очистки плазмидной сверхскрученной ДНК, подобно тому как это делают методом ультрацентрифугирования в градиенте концентрации раствора CsCl , но значительно проще и быстрее. В основе обоих методов лежит одно и то же явление — в линейную

или расправленную циркулярную ДНК бромистый этидий интеркалирует легче, чем в сверхскрученную. Более интенсивная интеркаляция приводит к менее прочной сорбции на оксиапатите. Смесь линейной и плазмидной ДНК сорбировали в объеме на смесь оксиапатита с целитом в присутствии раствора бромистого этидия, концентрацию которого подбирали так, что интеркаляция в линейную ДНК шла на уровне одной молекулы красителя на 3—4 пары оснований, в то время как в плазмидную ДНК интеркалировала одна молекула бромистого этидия в среднем на 6 пар оснований. Эту смесь вносили на колонку ($1,6 \times 12$ см) оксиапатита, уравновешенную 0,1 М Na-фосфатным буфером (рН 7,1), промывали тем же буфером с добавлением до 10 мкМ бромистого этидия, а затем элюировали ДНК линейным градиентом (300 мл) 0,1—0,5 М Na-фосфатного буфера с таким же содержанием красителя со скоростью 17 мл/ч. Пик линейной ДНК выходил раньше, чем сверхскрученной; разделение получалось вполне надежным [Pakropka et al., 1975].

Очистку плазмидной ДНК от примеси РНК (после осаждения ДНК бактерии-хозяина из «просветленного лизата») можно осуществлять в препаративном варианте на колонке оксиапатита и без участия бромистого этидия, но в присутствии 8 М мочевины, что обеспечивает сохранение однонитевой структуры РНК. Оксиапатит (1 г на 1 л лизата бактерий) суспендировали в 0,2 М Na-фосфатном буфере (рН 6,8) с добавлением до 8 М мочевины и заполняли им широкую колонку. Освобожденный от ДНК хозяина лизат без какой-либо дополнительной очистки разбавляли в соотношении 9 : 1 0,27 М Na-фосфатным буфером (рН 6,8) с 9 М мочевиной и 0,9% ДДС-Na и вносили в колонку. Ее промывали сначала тем же раствором, но без ДДС-Na, потом 0,01 М Na-фосфатным буфером без мочевины (при этой промывке сорбент один раз взмучивали и снова давали ему осесть). Все белки и РНК выходили из колонки в ходе промывок. Плазмидную ДНК элюировали 0,3 М Na-фосфатным буфером. По данным авторов, ее выход сильно варьировал от одной партии оксиапатита к другой. Из больших объемов бактериальных лизатов все нуклеиновые кислоты целесообразно сначала осадить этанолом. Показано, что разрывы в плазмидной ДНК в ходе очистки на оксиапатите не появляются [Colman et al., 1978].

Джонсон и Илан недавно отметили, что методика Колман и соавторов дает не всегда воспроизводимые результаты и загрязнение плазмидной ДНК белком и РНК в некоторых случаях оказываются значительными. Они ввели в эту методику промывку колонки с сорбированной на ней ДНК 0,35 М Na-фосфатным буфером (вместо 0,27 М) в присутствии 6 М мочевины. Такая промывка надежно удаляет РНК и белок. Они также показали возможность очистки на оксиапатите высокомолекулярной ДНК фага λ . Оказалось, что в присутствии 8 М мочевины эта ДНК сорбируется на нем обратимо [Johnson, Ilan, 1983].

Очистку на оксиапатите в сходных условиях использовали и для выделения внехромосомной (вирусной) ДНК из клеток высших

организмов. Здесь ДНК клетки-хозяина не удаляли из лизата. Напротив, ввиду своего гигантского размера она задерживалась на оксиапатите, в то время как вирусная ДНК элюировалась 0,5 М Na-фосфатным буфером. Для проведения этого опыта фибробласты почки зеленой обезьяны выращивали в культуре, заражали вирусом SV-40, промывали, снимали с питательной среды с помощью трипсина и ЭДТА, центрифугировали и вскрывали, добавляя на каждые 5×10^6 клеток по 2 мл раствора, содержащего 1% ДДС-Na, 8 М мочевины и 10 мМ ЭДТА в 0,24 М Na-фосфатном буфере (pH 6,8). Осветленный центрифугированием экстракт вносили прямо на колонку оксиапатита (из расчета 1 мл сорбента на $5 \cdot 10^6$ клеток), уравнивающим раствором. Промывка 8 М мочевиной в 0,24 М Na-фосфатном буфере удаляла с колонки все белки и РНК. Затем 0,15 М буфером отмывали мочевины и, наконец, медленно элюировали вирусную ДНК 0,5 М Na-фосфатным буфером. Высокополимерная ДНК хозяина оставалась на колонке. Анализ центрифугированием в градиенте плотности сахарозы показал, что 95% элюированной 0,5 М фосфатным буфером ДНК представляет собой сверхскрученную ДНК (форма I). Высокомолекулярную ДНК удается элюировать с оксиапатита после обработки суспензии сорбента ультразвуком [Shoyab, Sen, 1979].

Аналогичным образом удается очистить на оксиапатите суммарную нативную ДНК от РНК. Так, до 50 г личинок дрозофилы гомогенизировали в растворе, содержащем 0,5% ДДС-Na, 1 М NaClO₄ и 8 М мочевины в 0,12 М Na-фосфатном буфере (pH 6,8). Белки удаляли из лизата обработкой хлороформом с изоамиловым спиртом, а водную фазу вносили непосредственно на колонку оксиапатита. Промывку вели сначала раствором 8 М мочевины в буфере, а затем 0,14 М и 0,18 М Na-фосфатным буфером удаляли с колонки всю РНК. После этого ДНК элюировали 0,4 М Na-фосфатным буфером. Для более полного освобождения от РНК очистку ДНК на оксиапатите можно повторить [Cseko et al., 1979]. Для очистки малых количеств ДНК, например из тканей с малым ее содержанием, сходный метод был описан еще в 1974 г. [Britten et al., 1974].

Приведенные примеры иллюстрируют возможность использования оксиапатита для очистки более или менее высокополимерной ДНК. На колонках с этим сорбентом удается фракционировать и короткие фрагменты ДНК по их длине. Для фрагментов денатурированной ДНК длиной от 4 до 180 нуклеотидов такое фракционирование было недавно описано [Wittelsberger, Hansen, 1979]. Авторы использовали посадку смеси фрагментов на оксиапатит в воде и элюцию линейным градиентом концентрации фосфатного буфера (0—0,1 М — для очень коротких фрагментов, 0—0,35 М — для более длинных).

Фрагменты нативной ДНК длиной до 10 пар нуклеотидов тоже можно фракционировать на колонках оксиапатита, хотя и в несколько сдвинутых в сторону больших концентраций градиентах фосфатного буфера. Более длинные фрагменты нативной ДНК элю-

ируются (как уже упоминалось) практически независимо от их длины. Надо отметить, что разрешение близких по размерам фрагментов ДНК весьма посредственно, однако в тех случаях, когда стоит задача разделения коротких рестриктазных фрагментов ДНК, достаточно отличающихся друг от друга по своим размерам, метод может себя оправдать.

Ступенчатая элюция 0,05 М фосфатным буфером элюирует однонитевые фрагменты ДНК длиной 50—150 нуклеотидов, 0,1 М фосфатный буфер снимает фрагменты в 150—500 нуклеотидов. Более длинные однонитевые ДНК элюируются уже 0,2 М буфером.

РАЗДЕЛЕНИЕ ДВУНИТЕВОЙ И ОДНОНИТЕВОЙ ДНК

Различие в прочности сорбции на оксиапатите нативной (двунитевой) и денатурированной (однонитевой) ДНК широко используется для исследования структурного состава ДНК по скорости ее ренатурации в ходе «отжига», для выявления однонитевых участков, для отделения гибридных молекул (ДНК—РНК) от однонитевых партнеров и др.

Денатурацию чаще всего осуществляют кратковременным нагреванием раствора ДНК в 0,12 М Na-фосфатном буфере до 97°, ренатурацию — охлаждением до так называемой «критической температуры», которая на 20—25° ниже «температуры плавления» данной ДНК. Эту операцию, по аналогии с технологией обработки стали, называют «отжигом». В отсутствие денатурирующих добавок температура отжига обычно близка к 60°; в случае высокого содержания в ДНК ГЦ-пар она может быть заметно выше. Степень ренатурации пропорциональна произведению исходной концентрации раствора ДНК и времени отжига, которое обозначают символом C_0t . Перед денатурацией ДНК необходимо тем или иным способом раздробить на фрагменты длиной 400—500 нуклеотидных пар. Без такого дробления не только сильно замедлится процесс ренатурации, но и благодаря наличию разбросанных по длине ДНК одинаковых (повторяющихся) последовательностей нуклеотидов может образоваться пространственная сетка молекул ДНК.

По истечении выбранного для ренатурации времени раствор ДНК вносят на колонку оксиапатита, уравновешенную в 0,12 М Na-фосфатным буфером и термостатированную при критической температуре отжига. Колонку промывают 5—10 объемами того же (подогретого) буфера; в первых порциях элюата из колонки выходит однонитевая ДНК. Затем, не снижая температуры, увеличивают концентрацию элюирующего фосфатного буфера до 0,4—0,5 М; при этом с оксиапатита десорбируется двунитевая ДНК. Количество той и другой ДНК можно оценить по площади пиков оптической плотности с учетом гиперхромизма однонитевой ДНК или по радиоактивности.

Иногда наблюдается неспецифическая сорбция некоторого ко-

личества однонитевой ДНК на колонке оксиапатита. Для ее уменьшения можно ввести в элюирующий буфер 8 М мочевины. При этом концентрацию Na-фосфатного буфера, которым уравнивают колонку и начинают элюировать, рекомендуется увеличить до 0,2 М, а температуру элюции — снизить до 40° [Britten et al., 1974]. Роль неспецифической сорбции возрастает при очень малых нагрузках колонки. В таких случаях перед началом хроматографии имеет смысл добавить в препарат балластную гетерологичную ДНК до общей загрузки, составляющей не менее 50 мкг ДНК на 1 мл объема колонки. Разумеется, это можно делать лишь в том случае, когда имеется возможность регистрировать на выходе из колонки только исследуемую ДНК, например если она радиоактивна.

Исследование ренатурации ДНК с помощью сорбции на оксиапатите можно вести и в объеме. Например, аликвоты ДНК, ренатурирующей при температуре отжига, переводили в 0,156 М K-фосфатный буфер и смешивали с суспендированной в том же буфере кашицей оксиапатита, затем перемешивали в течение 15 мин и центрифугировали в настольной центрифуге. Выход однонитевой ДНК определяли в супернатанте, а всю остальную ДНК считали ренатурировавшей и сорбированной на оксиапатите. Для подавления неспецифической сорбции добавляли немеченную тимусную ДНК [Paetkau, Langman, 1975].

Использование колонок оксиапатита для исследования процессов ренатурации ДНК было подробно описано еще в 1974 г. [Britten et al., 1974]. В недавно опубликованной работе по кинетике ренатурации ДНК человека и мыши авторы предпочли K-фосфатный буфер и несколько иной подход к разделению нативной и денатурированной ДНК. Вначале они сорбировали на колонку оксиапатита всю ДНК в 0,03—0,05 М буфере при 50°, а затем вели элюцию линейным градиентом концентрации K-фосфатного буфера (0,03—0,4 М). Авторы утверждают, что разделение денатурированной и нативной ДНК в этом случае осуществляется более надежно [Soriano et al., 1981].

Палиндромы в ДНК обнаруживаются путем кратковременной ренатурации денатурированной ДНК, гидролиза всей не успевшей ренатурировать ДНК нуклеазой S1 (специфической для однонитевой ДНК) и задержания на колонке оксиапатита двунитевых фрагментов, которые в этих условиях образуют только палиндромы. Лин и Ли [Lin, Lee, 1979] вели денатурацию фрагментированной ультразвуком ДНК в щелочной среде, а ренатурацию — путем быстрой нейтрализации раствора и выдерживания его при повышенной температуре в течение 2 с. Затем раствор энергично охлаждали до 4° и диализовали на холоду против 0,1 М Na-ацетатного буфера (рН 5), содержавшего 0,1 мМ ацетата цинка, что необходимо для действия нуклеазы S1. Кроме того, к раствору добавляли половинный объем диоксана, который, как оказалось, почти втрое ускоряет и повышает эффективность действия фермента. Наконец, вносили саму нуклеазу S1 (80 ед/мл), выдерживали 45 мин при 37°, а затем, как обычно, гидролизат переводили диализом в 0,12 М Na-фосфат-

ный буфер и при температуре 60° вносили на колонку оксиапатита. Ее промывали тем же буфером, а палиндромы элюировали 0,4 М буфером. Длину палиндромных участков оценивали путем электрофореза в 4%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (98%-ный формамид).

ОЧИСТКА ГИБРИДОВ ДНК—РНК

Особенно широкое распространение получила в последние годы методика очистки на колонках оксиапатита комплементарной ДНК (кДНК), синтезированной по матрице известной мРНК с помощью фермента обратной транскриптазы. Синтез проводят обычно в инкубационной смеси, куда, кроме матрицы мРНК и фермента в слегка щелочном буфере, вносят смесь четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, из которых по крайней мере один радиоактивен, а также «затравку», например олиго-дТ, образующую начальный комплекс с концевой поли(А)-последовательностью мРНК. Выход кДНК составляет примерно 2% от количества матрицы мРНК. Собственно, на этом этапе уже можно отделять двунитевые гибридные молекулы от РНК на оксиапатите. Однако в продукте реакции, кроме кДНК, синтезированной по матрице мРНК, неизбежно присутствует и вторичный продукт — ДНК, синтезированная уже по матрице самой кДНК, в том числе и двунитевые молекулы, состоящие из кДНК и вторичной ДНК. Для очистки истинной кДНК используют денатурацию всех двунитевых структур и последующую гибридизацию с большим избытком первоначальной мРНК (например, путем инкубации в нейтральном буфере, содержащем 0,4 М NaCl при 70° до $C_0t = 1500$ моль·с). Продукты гибридизации сорбируют на колонке оксиапатита, уравновешенного 0,12 М Na-фосфатным буфером (рН 6,9) с 0,2% ДДС-Na, при 60°. В этих условиях РНК и однострунчатая ДНК не сорбируются. Гибриды кДНК—мРНК можно затем элюировать 0,2 М Na-фосфатным буфером (рН 6,9) в присутствии 1% ДДС-Na и 8 М мочевины (для подавления неспецифической сорбции) при 40°. Остаточные дуплексы ДНК—ДНК в этих условиях не элюируются. Их можно снять, увеличив концентрацию фосфатного буфера или повысив температуру до 85°. РНК из гибридной молекулы после диализа против 0,02 М Трис-буфера можно удалить щелочным гидролизом (0,25 М NaOH, 37°, 16 ч). Затем раствор нейтрализуют и осаждают кДНК этанолом [Galau et al., 1981].

Аналогичным способом гибридизации с избытком мРНК и очистки гибридов на оксиапатите можно отобрать из обширной популяции фрагментов денатурированной суммарной ДНК те, которые содержат кодирующий эту мРНК участок генома. Некоторые исследователи и в этих опытах отдают предпочтение элюции линейным градиентом концентрации фосфатного буфера. Например, Батхерст и соавторы вели гибридизацию [³H]-кДНК с избытком мРНК в 0,24 М Na-фосфатном буфере (рН 6,8), содержавшем 0,2% ДДС-Na и 1 мМ ЭДТА, при 70°. Гибридизацию заканчивали раз-

бавлением смеси в 10 раз ледяной водой. Затем все нуклеиновые кислоты сорбировали на маленькой колонке оксиапатита ($1 \times 2,5$ см), уравновешенной 0,025 М Na-фосфатным буфером, при 60°. Для элюции использовали линейный градиент концентрации (0,025—0,4 М) Na-фосфатного буфера с pH 6,8. Однонитевые молекулы РНК и гибриды РНК—ДНК выходили в виде хорошо разделенных пиков [Bathurst et al., 1980].

Можно было бы процитировать множество вариантов метода очистки гибридных молекул от однонитевых исходных партнеров на колонках оксиапатита, однако с хроматографической точки зрения они не представляют большого интереса. По существу, это всегда не истинно хроматографическое фракционирование, а простейший процесс разделения двух компонентов (однонитевых и дву- нитевых молекул НК), весьма существенно различающихся по прочности их сорбции на оксиапатите.

ОЧИСТКА НК И НУКЛЕОПРОТЕИДОВ ОТ ГЛИКОГЕНА

Полисахариды, в частности гликоген, слабо сорбируются на оксиапатите. Этим можно воспользоваться для существенной очистки НК в ходе их выделения от сопутствующего им гликогена (нередко встречающееся использование для этой цели амилазы рекомендовать нельзя — в ней всегда могут оказаться примеси нуклеаз).

В ходе выделения раствор ДНК, содержащий гликоген, можно перевести в 0,12 М Na-фосфатный буфер и внести на широкую и короткую колонку оксиапатита, уравновешенного тем же буфером (можно использовать и стеклянный фильтр с нанесенным на него слоем оксиапатита). Гликоген почти полностью отмывается тем же буфером, а ДНК элюируют 0,4—0,5 М фосфатным буфером. Высокополимерная ДНК очень медленно элюируется с колонки; в этом случае очистку удобнее вести в объеме [Graham, 1978].

Аналогичную операцию можно использовать и для очистки от гликогена рибосом или полисом [Hoffman, Plan, 1977]. Полисомы, как и двунитевые ДНК, сорбируются на оксиапатите в 0,15 М фосфатном буфере, а элюируются — 0,4 М буфером. Очистку препарата полисом от гликогена удобно вести на стеклянном фильтре, где на влажном бумажном фильтре «Whatman № 3» осторожно формируют слой оксиапатита толщиной 2—3 мм. С помощью умеренного вакуума его промывают 10 объемами 0,15 М К-фосфатного буфера (pH 6,5), куда перед самым использованием следует добавить до 10 mM $MgCl_2$ (для предотвращения диссоциации рибосом). В этом же буфере вносят препарат полисом, отмывают гликоген 10—15 объемами буфера, а затем элюируют полисомы 0,4 М К-фосфатным буфером, содержащим 20 mM $MgCl_2$. Последний следует также добавлять в буфер непосредственно перед элюцией, а после ее окончания необходимо сразу же переходить к следующим этапам очистки, освобождая препарат от фосфатного буфера, — все это из-за того, что

концентрация Mg^{2+} может постепенно снижаться за счет выпадения в осадок $MgHPO_4 \cdot 7H_2O$.

Описанная очистка не удаляет весь гликоген полностью, но сильно уменьшает его примесь (до 10—15%), в то время как при первоначальном осаждении полисом центрифугированием количество гликогена для некоторых объектов может оказаться заведомо больше, чем самих полисом.

ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ВИРУСОВ

На оксиапатите можно очищать и концентрировать вирусы животных [Smith, Lee, 1978]. В освобожденную от клеток культуральную жидкость добавляют К-фосфатный буфер (рН 7,2) до концентрации 0,15 М, затем суспензию оксиапатита перемешивают на холоду в течение 3 ч, загружают в колонку, хорошо промывают тем же буфером и элюируют очищенный вирус 5—10 объемами колонки 0,5 М К-фосфатного буфера.

ОЧИСТКА БЕЛКОВ СОРБЦИЕЙ НА «ALUMINA C_γ» И ГЕЛЕ ФОСФАТА КАЛЬЦИЯ В ОБЪЕМЕ

Этот прием применяется сейчас относительно редко, поэтому ограничимся одним примером. Таким образом были очищены аминоксил-тРНК синтетазы из печени крысы. К супернатанту после высокоскоростного центрифугирования гомогената клеток в 0,1 М Трис-ацетатном буфере (100 000g; 1,5 ч) добавляли «Alumina C_γ» из расчета 0,4 мг на 1 мг белка и перемешивали в течение 20 мин. Гель собирали центрифугированием и трижды промывали в объеме 0,08 М Na-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 0,1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА и 10% глицерина. Синтетазы элюировали тремя порциями 0,2 М Na-фосфатного буфера (рН 7,4) с теми же добавками и 10% сульфата аммония. Объединенные элюаты диализовали против 0,05 М Na-фосфатного буфера. На втором этапе очистки в диализат вносили гель фосфата кальция (5 мг на 1 мг белка) и перемешивали 30 мин. Затем гель собирали центрифугированием, промывали четыре раза 0,13 М Na-фосфатным буфером и очищенные синтетазы элюировали с геля двумя промывками 0,1 М Na-фосфатным буфером с 10% сульфата аммония [Dignam, Deutscher, 1979].

НУКЛЕОПРОТЕИД-ЦЕЛИТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Способность кизельгура прочно сорбировать белки была использована В. С. Шапотом и сотрудниками, предложившими изящный метод фракционирования нуклеиновых кислот, входящих в состав клеточных нуклеопротеидов. Клетки гепатомы Зайделя, помечив предварительно в них РНК ^{14}C - или 3H -уридином, а ДНК — 3H -тимидином, вскрывали детергентом, а гомогенат вносили на колонку,

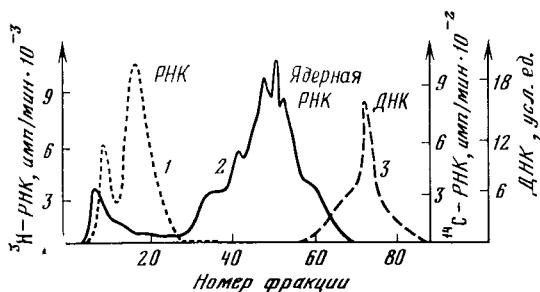


Рис. 107. Нуклеопротеид-целитная хроматография (см. текст) [Лихтенштейн и др., 1979]

- 1 — ^{14}C -РНК;
- 2 — ^3H -РНК;
- 3 — ДНК

заполненную целитом 545. Ее промывали буфером, а затем элюировали сначала линейным градиентом концентрации LiCl (0—4 M) и одновременно мочевины (0—8 M), а затем 4 M LiCl с 8 M мочевиной, ступенями повышая температуру элюента до 95° . Все нуклеопротеиды прочно сорбируются на целите за счет своих белков, а затем идет последовательная диссоциация от них нуклеиновых кислот. Таким образом, фракционирование осуществляется по прочности связи нуклеиновых кислот в нуклеопротеидных комплексах. Рибосомальные РНК диссоциируют от белков сравнительно легко, быстрометящиеся ядерные РНК для своей элюции требуют повышения температуры до 70° , ДНК выходит из колонки при температуре элюции $85\text{—}90^\circ$. На рис. 107 видно, что названные НК хорошо разделены между собой, а профиль элюции гетерогенных ядерных РНК явно многокомпонентен [Lichtenstein et al., 1972; Лихтенштейн и др., 1979]. Строго говоря, описанный экспериментальный подход не имеет прямого отношения к адсорбционной хроматографии. Сорбция белков на целите здесь служит лишь для иммобилизации нуклеопротеидов, что позволяет осуществить их фракционирование по прочности белково-нуклеинового взаимодействия.

ХРОМАТОГРАФИЯ НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗЕ

Ранее при рассмотрении метода электрофореза [Остерман, 1981] и описании различных вариантов элюции нуклеиновых кислот из гелей уже упоминался тот факт, что нитроцеллюлоза (в частности, нитроцеллюлозные фильтры) сорбирует однонитевые молекулы денатурированной ДНК, но не сорбирует нативную, двунитевую ДНК. Этим обстоятельством можно воспользоваться и в целях хроматографического фракционирования молекул ДНК по их структурным особенностям. Так, Пробст и соавторы использовали колонку, заполненную волокнистой нитроцеллюлозой, для того чтобы из фрагментированной в момент редупликации ДНК отобрать фрагменты, содержащие саму «вилку» редупликации, — именно за счет того, что в ее состав входят отрезки одиночных нитей ДНК. Фрагментированную путем криолиза ДНК они пропускали через колонку с сорбентом «Nitrocel S» фирмы «Serva» в 0,05 M Трис-буфере

(рН 6,75), содержащем 0,4 М NaCl и 1 мМ ЭДТА, промывали ее от двунитевых фрагментов тем же буфером, а для элюции в него добавляли 0,5 % ДДС-Na [Probst et al., 1979].

СОРБЦИЯ НА ПОРИСТОМ СТЕКЛЕ

Эта сорбция носит, по-видимому, ионный характер и происходит за счет отрицательно заряженных силанольных групп на поверхности стекла. Здесь трудно ожидать надежной воспроизводимости, поэтому, вероятно для фракционирования сорбцию на стекле применяют редко (заметим, однако, что сорбция на пористом стекле широко применяется для очистки и концентрирования вирусов). Были исследованы эффективность и условия сорбции аминокислот и белков на пористом стекле типа СРG-10 [Т. Mizutani, A. Mizutani, 1977]. Авторы элюировали белки со стекла растворами NaCl и щелочным буфером. В отличие от них, Габрер и соавторы, использовавшие сорбцию на СРG-10 в качестве первого этапа очистки интерферона, снимали его с колонки 0,4 М глицин-HCl-буфером (рН 3,5), т. е. за счет нейтрализации поверхности стекла [Gabrer et al., 1979].

Используя склонность высокомолекулярных РНК к агрегации в крепких солевых растворах, чему, по-видимому, способствует соседство сорбирующей поверхности раздела фаз, Мицутани удавалось проводить грубое фракционирование высокомолекулярных РНК на колонке пористого стекла типа СРG-10 (240 Å) в снижающемся (от 5 М до нуля) градиенте концентрации NaCl [Mizutani, 1983].

ЛИТЕРАТУРА

- Лихтенштейн А. В., Забойкин М. М., Моисеев В. Л., Шапог В. С.—Докл. АН СССР, 1979, 245, с. 1005—1009.
- Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981.
- Bathurst I. C., Craig R. K., Herries D. G., Campbell P. N.—Europ. J. Biochem., 1980, 109, p. 183—191.
- Bernardi G.—Meth. Enzymol., 1971a, 22, p. 325—339.
- Bernardi G.—Meth. Enzymol., 1971b, 21, p. 95—139.
- Bernardi G.—Meth. Enzymol., 1973, 27, p. 471—479.
- Bernardi G., Kawasaki T.—Biochim. et biophys. acta, 1968, 160, p. 301—310.
- Bernardi G., Bernardi A., Chersi A.—Biochim. et biophys. acta, 1966, 129, p. 1—11.
- Britten R. J., Graham D. E., Neufeld B. R.—Meth. Enzymol., 1974, 29, p. 363—418.
- Caiafa P., Scarpati-Cioffari M. R., Altieri F. et al.—Europ. J. Biochem., 1981, 121, p. 15—19.
- Caskey C. T., Scolnick E., Tompkins R. et al.—Meth. Enzymol., 1971, 20, p. 367—375.
- Colman A., Byers M. J., Primrose S. B., Lyons A.—Europ. J. Biochem., 1978, 91, p. 303—310.
- Cseko Y. M. T., Stone J., Sederoff R.—Biochim. et biophys. acta, 1979, 565, p. 253—264.
- Dignam J. D., Deutscher M. P.—Biochemistry, 1979, 18, p. 3165—3171.
- Doctor B. P., Brenner D. J., Miller W. L. Meth. Enzymol., 1974, 29, p. 419—431.
- Dubnoff J. S., Maitra U.—Meth. Enzymol., 1971, 20, p. 248—261.
- Feigen M. I., Johns M. A., Postlethwait J. H., Sederoff R. B.—J. Biol. Chem., 1980, 255, p. 10338—10343.
- Fox G. M., Umeda J., Lee R. K.-Y., Schmid C. W.—Biochim. et bio-

- phys. acta, 1980, 609, p. 364—371.
- Gabrer B., Taira H., Broeze R. J.* et al.—*J. Biol. Chem.*, 1979, 254, p. 3681—3684.
- Galau G. A., Ledock A. B., Greenway S. C., Dure L. S., III.*—*J. Biol. Chem.*, 1981, 256, p. 2551—2560.
- Geck P., Nász I.*—*Biochem.*, 1983, 135, p. 264—268.
- Graf H.*—*Biochim. et biophys. acta*, 1979, 564, p. 225—234.
- Graham D. E.*—*Anal. Biochem.*, 1978, 85, p. 609—613.
- Hoffman W. L., Ilan J.*—*Biochim. et biophys. acta*, 1977, 474, p. 411—424.
- Johnson T. R., Ilan J.*—*Anal. Biochem.*, 1983, 132, p. 20—25.
- Kiper M.*—*Anal. Biochem.*, 1978, 91, p. 70—74.
- Lichtenstein A. V., Alechina R. P., Shapot V. S.*—*FEBS Lett.*, 1972, 23, p. 254—256.
- Lin H. J., Lee C. L. H.*—*Anal. Biochem.*, 1979, 96, p. 144—151.
- MacGillivray A. J., Rickwood D., Cameron A.* et al.—*Meth. Enzymol.*, 1975, 40, p. 160—171.
- Markova N. G., Ivanov I. G., Markov G. G.*—*Anal. Biochem.*, 1978, 84, p. 633—637.
- Mazin A. L., Sulimova G. E., Vanyushin B. F.*—*Anal. Biochem.*, 1974, 61, p. 62—71.
- Mizutani T.*—*J. Chromatogr.*, 1983, 262, p. 441—445.
- Mizutani T., Mizutani A.*—*Anal. Biochem.*, 1977, 83, p. 216—221.
- Moldave K., Galasinski W., Rao P.*—*Meth. Enzymol.*, 1971, 20, p. 337—348.
- Oishi M.*—*Meth. Enzymol.*, 1971, 21, p. 140—147.
- Paetkau V., Langman L.*—*Anal. Biochem.*, 1975, 65, p. 525—532.
- Pakroppa W., Müller W.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1974, 71, p. 699—703.
- Pakroppa W., Goebler W., Müller W.*—*Anal. Biochem.*, 1975, 67, p. 372—383.
- Parmeggiani A., Singer C., Gottschalk E. M.*—*Meth. Enzymol.*, 1971, 20, p. 291—302.
- Pratt E. A., Fung L. W.-M., Flowers J. A., Ho C.*—*Biochemistry*, 1979, 18, p. 312—316.
- Probst H., Hofstaetter T., Stumpj C., Fraterman A.*—*Biochim. et biophys. acta*, 1979, 561, p. 132—146.
- Rubin R. A., Modrich P.*—*Meth. Enzymol.*, 1980, 65, p. 96—104.
- Shoyab M., Sen A.*—*Meth. Enzymol.*, 1979, 68, p. 199—206.
- Simon R. H., Felsenfeld G.*—*Nucl. Acids Res.*, 1979, 6, p. 689—696.
- Smith R. G., Lee S. A.*—*Anal. Biochem.*, 1978, 86, p. 252—263.
- Soriano P., Macaya G., Bernardi G.*—*Europ. J. Biochem.*, 1981, 115, p. 235—239.
- Winter H., Alonso A., Goerttler K.*—*Anal. Biochem.*, 1980, 105, p. 39—47.
- Wittelsberger S. F. C., Hansen J. N.*—*Biochim. et biophys. acta*, 1979, 565, p. 125—130.

ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ВВОДНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

При ионообменной хроматографии неподвижную фазу также образует твердая поверхность сорбента снаружи гранул и в их порах, точнее, не сама поверхность полимерных нитей, а разбросанные по ней и связанные с ней ионогенные группы. Кулоновским взаимодействием молекул (ионов) вещества с этими группами обуславливается их задержание в неподвижной фазе. В составе ионогенных групп сорбента исходно подразумеваются также те или иные (обычно простые, низкомолекулярные) контрионы. В контакте с водным растворителем контрионы могут диссоциировать от ионогенных групп, оставляя заряженные, связанные с матрицей ионы, а также могут замещаться другими контрионами или более крупными ионами вещества. В исходном сухом материале сорбента (ионообменника) контрионы всегда имеются в таком количестве, чтобы нейтрализовать заряды всех ионов.

Подвижная фаза (элюент) в том виде ионообменной хроматографии, который нас будет интересовать, всегда в основе своей водная. Главные ее физические параметры — pH, концентрация и природа растворенных солей. Определенную роль могут играть добавки органических растворителей, изменяющие полярность и диэлектрическую проницаемость элюента. Для подавления неспецифических взаимодействий вещества с материалом матрицы в элюент могут быть внесены мочевины, детергенты и др.

Фракционируемые вещества всегда должны нести на себе некий электрический заряд или по крайней мере обладать способностью к ионизации. Они могут представлять собой более или менее крупные ионы, цвиттерионы, т. е. в целом нейтральные молекулы, несущие равное число положительных и отрицательных зарядов, или амфолиты — крупные молекулы, на поверхности которых располагается несколько ионогенных групп, способных заряжаться (ионизироваться) и в зависимости от pH элюента создавать ту или иную мозаику электрических зарядов обоих знаков.

Протекание хроматографического процесса, как всегда, определяется в первую очередь значениями коэффициентов равновесного распределения (K) между неподвижной и подвижной фазами для каждого из компонентов хроматографируемой смеси веществ. Распределение вещества между фазами зависит от силы электростатического взаимодействия ионов или заряженных групп в молекуле вещества с заряженными группами ионообменника. Это взаимодействие определяется как природой самого вещества (и обменника), так и свойствами жидкой среды, в которой оно происходит, в част-

ности pH и содержанием в ней нейтрализующих заряды контрионов.

Как и для двух предыдущих видов хроматографии, здесь можно отметить, что для пористых сорбентов имеет место некий вклад геле-фильтрации, которым также можно пренебречь ввиду того, что за счет ионного взаимодействия $K \gg 1$.

Мы бегло упомянули основные особенности трех компонентов системы ионообменной хроматографии: ионообменника, элюента и вещества. Углубленное знакомство с ионообменной хроматографией целесообразно начать с более полного описания и характеристики всех компонентов, включив сюда и некоторые справочные данные о продажных ионообменниках. Это позволит нам подойти к обоснованию выбора параметров хроматографического процесса, а также в полной мере оценить приведенные далее многочисленные практические примеры.

КОМПОНЕНТЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

ИОНООБМЕННИКИ

Материалы матриц

Очень кратко (подробнее — см. гл. 2), именно с позиций приготовления ионообменников, напомним некоторые свойства используемых здесь материалов.

Полистирол (сшитый дивинилбензолом) имеет гидрофобную основу, но ионогенные группы расположены очень плотно, почти на каждом фенильном остатке, что придает в целом матрице гидрофильность и вместе с тем обеспечивает высокую «емкость» ионообменника (по крайней мере для низкомолекулярных ионов). Размер гранул — 40—80 мкм, пор — 5—20 Å. Матрица жесткая (для низких давлений), химически стойкая, рабочий диапазон pH 2—12.

Полиакрилат. Сшивка дивинилбензолом придает некоторую гидрофобность материалу матрицы, но заметно меньшую, чем в случае полистирола. Ионогенными группами служат сами карбоксильные группы остатков акриловой кислоты; плотность их расположения, очевидно, очень высока. Механические и физические параметры — примерно такие же, как у полистирола. Иногда встречаются матрицы на основе полимеров метакриловой кислоты.

Ионообменники на основе полистирола, полиакрилата или полиметакрилата по установившейся традиции нередко называют ионообменными «смолами» («resins»).

Целлюлоза — весьма гидрофильная матрица с очень крупными порами. Выпускаются волокнистые и микрогранулированные (химически «сшитые») целлюлозы. Последние дают лучшее разрешение за счет более однородных размеров пор, но их гидродинамические свойства в колонках хуже. Ионогенные группы присоединяются по гидроксилам целлюлозы. Варьируя условия модификации, можно выбирать плотность расположения ионогенных групп, а тем самым

и емкость сорбента. Целлюлоза не отличается жесткостью и может сминаться под давлением элюента при больших скоростях элюции. В зависимости от степени ионизации или экранирования зарядов ионогенных групп, за счет изменения сил их взаимного электростатического отталкивания, матрица может менять свой объем. Такие изменения, происходящие уже в колонке, могут приводить к необратимым деформациям гранул и резкому ухудшению условий течения элюента. По этой причине следует выбирать допустимые пределы изменений pH и ионной силы элюента в процессе элюции. Рабочий диапазон pH 3—10.

«*Sephacel*» — сферические гранулы химически «сшитой» целлюлозы производства фирмы «Pharmacia». Такая целлюлоза жестче и химически более устойчива, чем обычная; она отличается и лучшими гидродинамическими характеристиками.

Декстран («*Sephadex*») — очень гидрофильный материал. Присоединение ионогенных групп происходит также по гидроксилам полисахарида. Пористость и жесткость матриц на основе сефадексов зависит от процентного содержания «сшивки» (эпихлоргидрина). Модифицированные сефадексы для ионообменной хроматографии выпускаются на основе только двух типов сефадексов: G-25 и G-50. Размеры пор у модифицированных сефадексов значительно выше, чем у двух исходных типов матриц, за счет уже знакомого нам эффекта расталкивания одноименно заряженных ионогенных групп. Ионообменные сефадексы соответственно и менее жестки; их объемы тоже могут изменяться в зависимости от pH и ионной силы элюента. Особенно сильно это выражено у ионообменников, полученных на основе сефадекса G-50. Рабочий диапазон pH 2—12.

Агароза — очень гидрофильный материал с крупными порами и весьма жесткой матрицей, «каркас» которой образуют «пучки» линейных молекул полимера, связанных водородными связями. Модификация происходит также по гидроксилам полисахарида, но лишь на поверхности «пучков» каркаса и поэтому — с относительно малой плотностью расположения ионогенных групп. Химическая стойкость невысока. «Сшитые» агарозы фирмы «Pharmacia» (типа «*Sephagrose CL*») обладают повышенной химической и тепловой устойчивостью и еще большей жесткостью, чем обычная агароза.

Матрицы для ЖХВД. К их числу можно отнести особо мелкозернистые, с малым разбросом диаметров сферические ионообменники на основе полистирола (например типа «*Aminex*»), специально разработанные для использования в аминокислотных анализаторах и жидкостных хроматографах высокого давления. Для последней цели чаще всего применяют модифицированные присадкой ионогенных групп пористые силикагели.

Ионогенные группы

Для систематизации и анализа различных подходов к осуществлению процесса ионообменной хроматографии довольно широкий набор ионогенных групп, используемых в ионообменниках, имеет

смысл разделить на категории не только по знаку электрического заряда, но и по «силе» группы. «Сильными» условимся называть ионообменники (и соответственно ионогенные группы), которые остаются полностью ионизированными (сохраняют неизменным свой заряд) во всем диапазоне рабочих значений рН, при которых может идти фракционирование биологических молекул, т. е. хотя бы в диапазоне рН 3—11. «Слабыми» будем называть такие ионогенные группы (и соответственно ионообменники), которые оказываются ионизированными в ограниченной области значений рН и могут быть ионизированы не полностью (т. е. не все ионогенные группы в данном обменнике). Их ионизацией можно управлять путем изменения рН элюента в пределах диапазона рабочих значений рН. Деление это носит, разумеется, несколько условный характер: во всяком случае, в категорию «слабых» могут попадать обменники, отличающиеся друг от друга довольно значительно. Этот вопрос подробнее рассмотрен ниже, но сейчас при ознакомительном перечислении наиболее употребительных ионогенных групп с такой классификацией можно согласиться. Во избежание случайной путаницы напомним наименование двух категорий ионообменников в соответствии со знаками их электрических зарядов.

В *анионообменниках* (*анионитах*) ионогенные группы заряжены так же, как анод, т. е. положительно, и связывают из подвижной фазы отрицательно заряженные анионы. Эти ионообменники иногда называют «основными», или «щелочными», поскольку при замачивании сухих анионообменников в воде они ее защелачивают (за счет связывания с обменником протонов или диссоциации от него гидроксидов). В *катионообменниках* (*катионитах*) ионообменные группы, подобно катоду, заряжены отрицательно и связывают из раствора положительно заряженные катионы. Катионообменники иногда называют «кислыми обменниками» — при замачивании они закисляют воду.

Ниже приведены формулы, химические названия и сокращенные фирменные обозначения ионообменных радикалов. Название или обозначение радикала вместе с названием материала матрицы входит в наименование ионообменника (например, «карбоксиметилцеллюлоза», «DEAE-Sephadex»).

Отметим, что анионообменники с ионогенными группами двух последних типов разработаны для специальных целей. Так, радикалы «PEI» предназначены для связывания полианионов регулярного цепочечного строения, например олигонуклеотидов, а «РАВ» — для ковалентного присоединения белков и НК с помощью реакции диазотирования (для аффинной хроматографии).

Различие между сильными и слабыми ионообменниками наглядно иллюстрируют кривые титрования соответствующих ионогенных групп. Для всех сильных ионообменников (рис. 108) эти кривые практически одинаковы. На рис. 109 приведены кривые титрования для двух наиболее распространенных типов слабых ионообменников. Для других типов эти кривые выглядят несколько иначе, но качественная картина сохраняется — степень ионизации снижается от

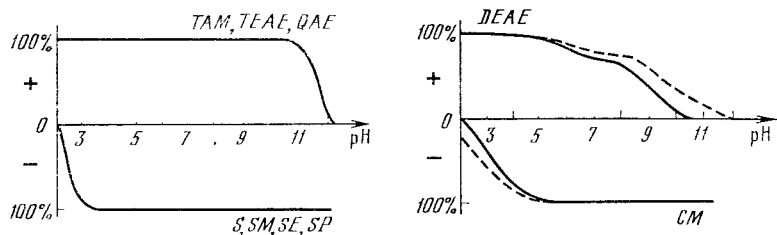


Рис. 108. Кривые титрования сильных ионообменников

100% соответствует максимальному заряду обменника, когда практически все его ионитные группы ионизованы

Рис. 109. Кривые титрования слабых ионообменников

Обозначения — см. рис. 108

100% до нуля постепенно, в пределах рабочих интервалов значений pH, захватывающих нейтральную область или лежащих неподалеку от нее. Пунктирные линии на рис. 109 указывают границы, до которых могут раздвигаться области титрования в присутствии поли-

Формула	Название	Обозначение
<i>Сильные катиониты</i>		
$-\text{SO}_3^-$	Сульфо-	S-
$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Сульфометил-	SM- •
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{SO}_3^-$	Сульфэтил-	SE-
$-\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$	Сульфопропил-	SP-
$-\text{PO}_3^-\text{H}$	Фосфо-	P-
<i>Слабые катиониты</i>		
$-\text{COO}^-$	Карбокси-	C-
$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Карбоксиметил-	CM-
<i>Сильные аниониты</i>		
$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Триметиламинометил-	TAM- •
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	Триэтиламиноэтил-	TEAE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Диэтил-2-оксипропил- аминоэтил-	QAE-
<i>Слабые аниониты</i>		
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_3$	Аминоэтил-	AE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Диэтиламиноэтил-	DEAE-
$-(\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_2)_n\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_3$	Полиэтиленимин-	PEI-
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+\text{H}_3$	Парааминобензил-	PAB-

электролитов, например белков. Отметим для дальнейшего, что кривые были сняты в 0,1 М растворе NaCl.

Для слабого ионообменника характерно не только сужение рабочего диапазона pH, но и уменьшение прочности сорбции вещества в пределах этого диапазона (в области изменения суммарного заряда). При тех значениях pH, когда ионизация слабого ионообменника не достигает 100%, имеет место динамическое равновесие заряженных и незаряженных состояний, в котором участвуют все ионогенные группы обменника. Это означает, что любая из них в какой-то момент времени оказывается нейтрализованной и перестает удерживать около себя ион вещества. Конечно, в тот же момент вместо нее станет ионизованной (приобретет заряд) другая ионогенная группа, но с ней одному из освободившихся ионов вещества еще надо «встретиться». В результате этого динамического процесса даже в условиях, когда число заряженных групп ионообменника (например, в пределах одной его гранулы) больше числа ионов вещества, часть последних в любой момент времени может оказаться свободной от связи с обменником и покинуть гранулу.

Контрионы

С изменением pH раствора, например при титровании ионообменника, происходит либо присоединение, либо диссоциация протонов от ионогенных групп с соответствующим изменением (появлением или исчезновением) их зарядов. Контрионы в растворе взаимодействуют с ионами обменника на расстоянии, связываются с ними кулоновскими силами взаимного притяжения и лишь экранируют их заряд. С позиций связывания ионов и молекул вещества, на первый взгляд, нет особой разницы между исчезновением электрического заряда, т. е. истинной нейтрализацией ионогенной группы, и ее экранированием. Однако такая разница есть — она касается прочности взаимодействий. Электростатические (кулоновские) силы взаимодействия между ионами несравненно слабее ковалентных связей. Выше мы говорили о том, что для слабых ионообменников акты присоединения и диссоциации протонов от ионогенных групп чередуются по времени, однако эти события происходят очень редко по сравнению с непрерывной «сутолокой» приближения, удаления и смены контрионов вблизи неподвижного иона обменника. То же самое происходит вблизи практически неизменных ионов сильного ионообменника. «Танец» контрионов в окрестности неподвижного иона определяется суперпозицией двух факторов: их броуновского движения под ударами молекул растворителя и постоянно действующей силы кулоновского притяжения. Эти факторы, очевидно, должны зависеть от физической природы контрионов: их размеров, формы и плотности электронных оболочек и др. Действительно, контрионы можно расположить во вполне определенные ряды активности, ориентируясь по способности одних контрионов оттеснять другие (при равенстве концентраций) из связи с ионами обменника. Приведем эти ряды в порядке убывания такой активности для анионов и катионов, вы-

делив в последнем случае двухвалентные катионы в отдельную группу.

Анионы: $I^- > NO_3^- > Br^- > CN^- > HSO_3^- > Cl^- > HCO_3^- > HCOO^- > CH_3COO^- > OH^- > F^-$. Катионы: $Ag^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ \approx NH_4^+ > Na^+ > H^+ > Li^+; Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+}$.

Знание этих рядов весьма полезно при выборе систем хроматографической элюции.

В сухом виде продажные ионообменники поставляются вместе с контрионами. Называя их, принято говорить о «форме» ионообменника. Например, указание на то, что данный катионообменник находится в «H⁺-форме» или «Na⁺-форме», означает, что его кислые ионогенные группы (остатки кислот) нейтрализованы соответственно ионами H⁺ или Na⁺. В одной из этих двух форм катионообменники обычно и поставляются фирмами-производителями. Анионообменники чаще всего производятся в OH⁻- или Cl⁻-форме. Выбор этих форм обусловлен, в частности, технологией приготовления обменников и, как мы увидим далее, не всегда удобен. Закисление или защелачивание воды при замачивании ионообменника имеет место только для обменников в H⁺- или OH⁻-форме.

Емкость ионообменника

Эта величина говорит о максимальном количестве ионов, которое может связать ионообменник. Для низкомолекулярных ионов она, очевидно, совпадает с концентрацией ионогенных групп. Емкость выражают числом миллиэквивалентов на 1 г сухого обменника (мэкв/г) или, что удобнее, на 1 мл упакованного в колонку набухшего обменника (мэкв/мл) — при значениях pH, соответствующих его 100%-ной ионизации.

Для высокомолекулярных ионов или амфолитов, например белков, имеет смысл говорить об «эффективной емкости» обменника, которая зависит от соотношения размеров молекул амфолита и среднего расстояния между ионогенными группами, а также от степени доступности всего объема пористой матрицы обменника для этих молекул. Заметим, что большое значение полной (низкомолекулярной) емкости ионообменника может оказаться невыгодным для хроматографии белков или нуклеиновых кислот, поскольку в этом случае возможна многоочечная фиксация макромолекул. В такой ситуации может оказаться целесообразным снижение полной емкости обменника за счет выбора значения pH, отвечающего неполной его ионизации; эффективная емкость для макромолекул при этом может остаться максимальной.

ЭЛЮЕНТ

Ограничимся перечислением физико-химических параметров элюента, влияющих на протекание хроматографического процесса. Сами эти параметры, по-видимому, не нуждаются в пояснениях; что же касается характера их влияния на ионообменную хроматогра-

фию белков и НК, то этот вопрос рассматривается в данной главе на протяжении всего последующего изложения.

Итак, при выборе режима хроматографии или при анализе результатов описанного в литературе хроматографического эксперимента следует оценить роль следующих параметров элюента: природы, концентрации, рН и емкости буфера, в частности близости выбранного значения рН к границе нормального диапазона эффективной буферной емкости; природы и концентрации ионов соли; температуры, вязкости и диэлектрической проницаемости растворителя (с ее уменьшением ослабляется ионизация обменника); наличия в элюенте добавок, обеспечивающих нативность биологического препарата (глицерин, β -меркаптоэтанол или ДТТ, ионы Mg^{2+} и др.), улучшающих его растворимость или препятствующих агрегации его молекул (детергенты, мочевины, органические растворители), блокирующих неспецифическую сорбцию вещества на материале матрицы (мочевина, детергенты и др.).

ХРОМАТОГРАФИРУЕМЫЕ ВЕЩЕСТВА

Для ионообменной хроматографии наибольшее значение имеют следующие характеристики вещества: размер (масса) и форма молекул — с позиций легкости их проникновения в поры матрицы ионообменника и скорости диффузии в жидких фазах системы; значения pK для ионов, изоэлектрической точки (pI) для цвиттерионов амфолитов, а также ход кривых их титрования. Весьма желательно иметь представление и о распределении ионогенных групп по поверхности макромолекул амфолита для оценки возможностей локальных взаимодействий с обменником или пространственного соответствия этого распределения и средних расстояний между ионогенными группами на поверхности обменника.

Важную информацию о веществе представляют собой оценка степени его гидрофобности, и, если возможно, представление о характере распределения гидрофобных участков на поверхности макромолекулы. Необходимо также оценить склонность молекул вещества к образованию водородных связей. Гидрофобные взаимодействия и водородные связи, как правило, являются главными факторами, обуславливающими неспецифическую сорбцию вещества на материале матрицы.

Во многих случаях хроматографического фракционирования и очистки биологических макромолекул бывает нужно позаботиться о сохранении их нативности. Для этого, во-первых, надо ясно себе представлять допустимый интервал рН, концентраций соли или иных добавок к элюенту, а во-вторых, следует оценить опасность денатурации макромолекулы за счет ее деформации (растяжения) в результате самого акта взаимодействия с обменником, как специфического (ионного) — за счет многоточечного связывания, так и неспецифического — за счет гидрофобных и иных побочных взаимодействий с материалом матрицы. Как уже упоминалось, добавление некоторых компонентов в элюент может оказаться необходимым именно для сохранения нативности биологического препарата.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС

Остановимся теперь более подробно на особенностях процесса ионообменной хроматографии и способах воздействия на него. Рискую повториться в чем-то, мы полагаем целесообразным начать с довольно детального (хотя и качественного) описания физической картины ионных взаимодействий внутри гранул ионообменника. Ясное «видение» этой картины может существенно облегчить понимание результатов и особенностей протекания хроматографического процесса в тех случаях, с которыми предстоит столкнуться читателю в его практике и которые никакое руководство не может заранее предусмотреть.

ИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВА И СОРБЕНТА

По всему объему гранулы сорбента, на поверхностях пор или нитях пространственной сетки полимера статистически равномерно распределены неподвижно закрепленные ионогенные группы. Представим себе, каковы расстояния между ними. Из приведенных ниже фирменных данных по самым разнообразным ионообменникам видно, что значения их полной емкости, т. е. плотности распределения ионогенных групп по объему набухшего и упакованного в колонку обменника, укладываются в довольно широкий интервал — от 0,05 до 1,7 мэкв/мл (и даже 3,3 мэкв/мл для полиакрилата). Объем самих гранул составляет около 60% их упакованного объема в колонке. С учетом этого обстоятельства и с помощью числа Авогадро нетрудно подсчитать, что средние расстояния между ионогенными группами варьируют не так уже сильно, примерно в диапазоне 10—30 Å (отношение концентраций пропорционально третьей степени отношения линейных размеров). Конечно, для крупнопористого обменника эти цифры довольно условны, поскольку расстояния между группами вдоль нитей полимера, очевидно, заметно меньше, чем в «поперечных» направлениях — при переходах от одной нити пространственной решетки к другой. Средние линейные размеры пор перекрывают диапазон от 5—20 Å для обменников на основе полистирола до нескольких сотен ангстрем для ионообменников на основе агарозы и ионообменных целлюлоз. Следует указать, что молекула БСА ($M = 69\,000$) имеет в поперечнике около 70 Å, а молекула γ -глобулина ($M = 150\,000$) — около 100 Å. Из сопоставления приведенных цифр можно заключить, например, что молекула белка даже среднего размера имеет хорошие возможности оказаться в контакте с несколькими ионогенными группами любого обменника и если ионообменник относится к сильным и все его группы ионизированы, то образовывать с ними многоточечную связь. Другое сопоставление позволяет подтвердить уже высказанные в предыдущих главах сомнения в возможности использования силикагелей со средним размером пор 60 и даже 100 Å для успешной ИХВД белков. Вместе с тем перемещение белковой глобулы с поперечником 70 Å внутри простран-

венной решетки со стороной 300 Å произойдет довольно свободно — примерно так же, как теннисного мячика внутри пустой коробки кубической формы с ребром длиной 30 см.

Уже упоминалось, что в сильном ионообменнике все ионогенные группы ионизированы и несут электрический заряд, а в слабом — ионизирована только вполне определенная (зависящая от pH) часть этих групп. Но даже и в сильном обменнике в каждый данный момент времени далеко не все ионизированные группы доступны для электрического взаимодействия с ионами и молекулами вещества. В растворе элюента внутри гранул находятся контрионы, «блокирующие» электрические заряды этих групп. Как минимум, это — протоны, гидроксилы или другие исходные контрионы самого ионообменника. К ним присоединяются ионы буфера и соли, которую обычно именно для этой цели вносят в элюент. При сближении под действием взаимного притяжения контриона и иона образуется ионная пара. Вне ее электрическое поле исчезает, поскольку происходит наложение полей двух единичных зарядов противоположного знака. Таков смысл термина «блокирование» заряда ионогенной группы.

Каждый единичный акт блокирования длится недолго — под тепловыми ударами молекул воды легкие контрионы отходят, обнажая заряды неподвижных ионов обменника. Но на их место вскоре становятся другие контрионы (если бы обнажение заряда иона сопровождалось свечением и мы бы могли это видеть, то нашим глазам предстала бы волшебная картина мерцания бесчисленного множества разбросанных в толще обменника огоньков).

Чем выше концентрация соли (или буфера) в элюенте, тем меньше времени каждый из зарядов ионообменника будет оставаться открытым и соответственно меньшее число их будет открыто одновременно (в нашей воображаемой картинке вспышки света стали бы короче, а число огоньков уменьшилось бы). Дополним теперь эту картину сравнительно медленно диффундирующими внутрь гранул молекулами хроматографируемых веществ. Интересующие нас биологические молекулы являются цвиттерионами (аминокислоты) или амфолитами (белки, НК). Цвиттерионы несут два заряда — положительный и отрицательный. В изоэлектрической точке на долю каждой молекулы цвиттериона (например, аминокислоты) в среднем приходится по одному положительному (аминогруппа) и одному отрицательному (карбоксил) заряду. Но это лишь в среднем — на самом деле, кроме нейтральных цвиттерионов, несущих оба заряда, в любой момент времени при $pH = pI$ в растворе будет находиться еще и статистически одинаковое число положительно и отрицательно заряженных ионов, у которых одна из двух ионогенных групп в этот момент окажется неионизированной. При $pH > pI$ в совокупности всех молекул число отрицательных зарядов превысит число положительных, однако в растворе окажется еще очень много молекул, несущих заряды обоих знаков или даже положительно заряженных. Лишь соотношение количеств разноименно заряженных ионов изменится в пользу молекул, несущих отрицательный заряд, и тем сильнее, чем выше значение pH. Аналогичные рассуждения можно про-

вести и для случая $pH < pI$, когда бо́льшая часть ионов (по далеко не все) будет заряжена положительно. Процессы диссоциации и ассоциации ионогенных групп в растворе идут спорадически, и отдельные молекулы в зависимости от меняющегося заряда непрерывно переходят из одной категории в другую и обратно, но в целом законы статистики строго поддерживают количественные пропорции различных заряженных ионов и цвиттерионов, отвечающие каждому значению pH элюента.

В принципе точно такая же ситуация имеет место и в случае амфолитов, например белков. Разница лишь в том, что вместо двух зарядов противоположного знака суммарный электрический заряд макромолекулы определяется совокупностью множества положительных зарядов (у белка — за счет остатков Lys, Arg и His) и множества отрицательных (за счет остатков Asp и Glu). Существенно отметить, во-первых, что как при $pH = pI$, так и при любых других значениях pH в огромной популяции молекул амфолитов имеются как в целом нейтральные, так и суммарно положительно и отрицательно заряженные молекулы (с изменением pH изменяются лишь их пропорции), а, во-вторых, каков бы ни был суммарный электрический заряд молекулы амфолита (например, белковой глобулы), на ее поверхности почти наверняка найдутся заряженные группы обоих знаков. Эта ситуация в общем-то уже знакома по рассмотрению картины электрофореза [Остерман, 1981]. Но здесь ее последствия могут быть более серьезными. При электрофорезе направление миграции белковой молекулы в электрическом поле определяется знаком ее суммарного заряда, а в ионообменной хроматографии на первый план выступают локальные электростатические взаимодействия. И можно себе представить такой случай, когда, например, суммарно заряженные положительно макромолекулы будут задерживаться на положительно же заряженном анионообменнике за счет взаимодействия с матрицей своих отрицательно заряженных групп, если последние, даже будучи в меньшинстве, окажутся в непосредственном соседстве с ионизированными группами обменника, что зависит от пространственной ориентации макромолекул.

Как и у обменника, заряды цвиттерионов и заряды на поверхности амфолитов блокируются сменяющими друг друга контрионами. Это относится к зарядам и контрионам обоих знаков. Наличие последних обеспечивается добавлением соли или составом буфера.

Из всего сказанного следует, что для возникновения электростатической связи между молекулой вещества и ионообменником должно иметь место совпадение трех следующих событий. В ходе своей тепловой диффузии внутри гранулы обменника молекула (амфолита) должна подойти к нити полимера или стенке поры так, чтобы разноименно заряженные ионы на поверхностях сорбента и молекулы оказались сближенными до расстояния, на котором эффективно действует кулоновская сила притяжения разноименных зарядов. В этот момент оба сблизившихся иона должны оказаться незаблокированными контрионами. Хотя вероятность такого совпадения кажется и небольшой, но число столкновений с поверхностью обменника, кото-

рые испытывает каждая молекула вещества за единицу времени, настолько велико, что за «разумный» промежуток времени (например, за несколько минут) практически для каждой молекулы вещества благоприятная ситуация реализуется хотя бы однажды, и молекула окажется связанной с матрицей обменника. Ее поступательное движение прекратится, хотя под тепловыми ударами молекул воды она будет поворачиваться около точки своей фиксации (если она единственная).

«Оторвать» биологическую макромолекулу от матрицы после этого будет нелегко, во-первых, из-за того, что большая масса обуславливает инерционность ее поведения, во-вторых, из-за того, что разнонаправленные импульсы ударов о поверхность макромолекулы многих молекул воды будут уравнивать друг друга. Тем не менее неизбежно наступит момент, когда равнодействующая этих импульсов окажется достаточно большой для того, чтобы удалить молекулу на такое расстояние, где кулоновское притяжение между двумя ранее сближенными ионами перестанет играть существенную роль, — молекула оторвется от матрицы. Если концентрация соответствующих контрионов в окрестности ионов мала и оба иона в течение некоторого времени будут сохранять свои свободные заряды, то есть немало шансов за то, что недалеко отошедшая (в силу инертности) молекула вещества за счет броуновского движения вновь сблизится с ионом матрицы так, что кулоновское притяжение завершит ее закрепление на прежнем месте.

Если же концентрация контрионов велика и они немедленно блокируют хотя бы один из ранее взаимодействовавших ионов, то молекула вещества окончательно оторвется от данной точки матрицы и возобновит свое диффузионное движение до тех пор, пока совпадение благоприятных условий не фиксирует ее в новой точке внутри гранулы или пока она не покинет пределы гранулы обменника и не будет унесена током элюента. Легко себе представить, что для каждого обменника, каждого значения pH элюента и концентрации соли будет устанавливаться свое динамическое равновесное распределение фиксированных и свободных молекул независимо для каждого сорта молекул, входящих в состав данного препарата (при условии, что они не будут мешать друг другу, т. е. при условии большого избытка емкости обменника). Очевидно, что этим равновесием определяются и значения коэффициентов распределения (K) между неподвижной и подвижной фазами для всех компонентов смеси веществ, а следовательно, и условия их хроматографического фракционирования.

До сих пор, рассматривая процесс, мы игнорировали наличие других зарядов на поверхности молекулы. С позиций самого акта взаимодействия одного из ее зарядов с неподвижным ионом обменника это оправдано, так как силы кулоновского взаимодействия быстро уменьшаются с увеличением расстояния между зарядами. Однако из приведенных выше цифр можно заключить, что расстояния между зарядами на поверхности, например белковой молекулы и между ионогенными группами на обменнике, имеют один и тот же порядок.

Это означает возможность следующей цепи событий. Молекула белка в результате образования электростатической связи одного из своих зарядов с неподвижным ионом матрицы закрепляется на нити обменника в одной точке. Она совершает тепловые колебания, поворачиваясь относительно этой точки. Может оказаться, что при одном из таких поворотов второй заряд на поверхности молекулы окажется вблизи заряда, расположенного на той же или другой нити обменника, и возникает вторая электростатическая связь молекулы вещества с неподвижной матрицей. Такое событие качественно изменяет ситуацию. Закрепление молекулы на обменнике оказывается не вдвое, а примерно на порядок более прочным. Это обусловлено относительной независимостью двух связей, что позволяет им как бы «страховать» друг друга. Представим себе, что под тепловыми ударами молекул воды одна из связей (допустим, первая) разорвалась. Удерживаемая второй связью молекула вещества не сможет далеко отойти от места контакта, она колеблется около второй точки связи, и весьма вероятно, что в ходе этих колебаний первая связь восстановится. В другой момент две связи могут поменяться ролями.

Чтобы вклиниться в это явление «взаимной страховки», т. е. блокировать восстановление первой разорванной связи до того момента, пока разорвется и вторая, потребуется очень большое увеличение концентрации констрионов соли в элюенте. Если же молекуле белка удастся закрепиться в трех или большем числе точек, то снять ее может оказаться трудно или даже невозможно (произойдет необратимая сорбция вещества на обменнике). Вероятность пространственного совпадения трех и более пар зарядов кажется сомнительной, но она существенно возрастает для обменников с густо расположенными зарядами (т. е. большой емкости). Кроме того, надо иметь в виду возможность некоторой деформации самой белковой глобулы, в том числе под действием сил гидрофобного взаимодействия с матрицей обменника. Верно и обратное: многоточечный контакт белка с обменником может послужить причиной его деформации вплоть до денатурации, иногда необратимой.

Если многоточечные контакты белков с обменником и удастся разорвать при значительном увеличении концентрации соли, эта ситуация все равно оказывается неблагоприятной для хроматографического фракционирования. При повышении солевой концентрации среднее число связей, удерживающих белок на обменнике, постепенно уменьшается, но до тех пор, пока сохраняется (в среднем) хотя бы одна связь, белок остается неподвижным. Затем незначительного увеличения концентрации соли оказывается достаточно для того, чтобы белок «снялся» с обменника. При этом условия для нового связывания белка могут оказаться столь неблагоприятными, что он, вместо того чтобы, покинув исходную зону, сорбироваться ниже по длине колонки (как это должно быть в истинно хроматографическом процессе), будет двигаться вместе с элюентом и быстро покинет колонку. Процесс сорбции—десорбции окажется зависящим от малого изменения большой величины (концентрации соли), а это, как известно, очень невыгодно для любого регулируемого процесса.

Даже если удастся тонко подобрать благоприятные условия для элюции одного из белков, они окажутся неблагоприятными для остальных — тоже связанных во многих точках, но с иной прочностью. Одни из этих белков, не разделившись между собой, «снимутся» с матрицы и покинут колонку, другие же останутся на исходных позициях. Хроматографического разделения смеси не получится.

Другое дело, если вместо истинно хроматографического разделения ставится задача поочередной элюции белков с колонки за счет различия пороговых концентраций соли, обеспечивающих их десорбцию. В случае, когда такое различие значительно (для небольшого числа компонентов смеси), белки могут прекрасно отделяться друг от друга, но это уже, собственно говоря, не хроматография. В таком случае длину колонки можно взять минимальной, так чтобы только обеспечить необходимую емкость для связывания всего исходного препарата.

В силу всего сказанного для успешного хроматографического фракционирования крупных амфолитов, например, белков, предпочтительно использовать ионообменники малой емкости и до внесения препарата уравнивать их растворами соли такой концентрации, которая гарантировала бы образование в основном не более чем двухточечных связей белков с обменником.

УПРАВЛЕНИЕ СИЛОЙ ИОННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Описанная картина ионных взаимодействий веществ с обменником подсказывает два главных способа управления силой этих взаимодействий (прочностью ионной сорбции), а следовательно, и значениями коэффициентов распределения компонентов смеси веществ между фазами, и возможностью их хроматографического фракционирования: во-первых, управление степенью ионизации ионогенных групп обменника и вещества путем вариации рН буфера и, во-вторых, регулирование степени блокирования их зарядов путем выбора концентрации соли в элюенте. Рассмотрим эти способы подробнее.

Выбор рН буфера

Для слабых ионообменников выбор рН буфера определяет степень ионизации их ионогенных групп, которая влияет на прочность связывания вещества прежде всего через изменение плотности распределения зарядов по объему сорбента и соответственное изменение возможностей многоточечной сорбции. Кроме того, и сами процессы нейтрализации или ионизации ионогенных групп сорбента при сдвигах рН буфера соответственно затрудняют или способствуют взаимодействию вещества с обменником. С другой стороны, рН буфера определяет знак и среднее значение суммарного электрического заряда молекул вещества, полноту ионизации его ионогенных групп, число и характер распределения зарядов обоих знаков на поверхности молекул амфолитов. Сочетание двух упомянутых эффектов выбора рН может в широком диапазоне изменять характер и силу взаимо-

действия вещества с обменником и, что особенно важно, соотношение этих сил для разных компонентов смеси веществ. Поясним это на простых примерах.

На рис. 110 изображены кривые титрования трех аминокислот: глицина (Gly), аспарагиновой кислоты (Asp) и лизина (Lys). По оси ординат отложены значения суммарного заряда молекул в зависимости от pH (нас не должно смущать то, что кривые идут плавно, т. е. суммарный заряд может быть представлен не целым числом элементарных зарядов электрона, ведь графики показывают значения, усредненные для множества молекул). Пунктирами на том же рисунке отмечены области сохранения заряда двух сильных ионообменников (AG-1 и AG-50 — см. ниже). Значения зарядов по оси ординат мы здесь указать не можем, но можно горизонтальными линиями условно отметить уровни 100 %-ной ионизации этих обменников.

Рассмотрим соотношение электрических зарядов всех трех аминокислот (предположим, что нам их надо разделить) и ионообменников при различных значениях pH. Легко видеть, что разделение целесообразно провести на катионообменнике AG-50 при pH 3,5. В этом случае молекулы Asp заряжены в целом отрицательно; они практически не будут задерживаться на максимально отрицательно заряженном обменнике и выйдут в свободном объеме колонки. Gly и Lys заряжены в целом положительно и будут сорбироваться на катионите. Положительный заряд Lys в среднем равен +1 и в несколько раз выше, чем у Gly. Это означает, что действительно положительно заряженные молекулы будут явно преобладать в популяции молекул Lys. Ввиду статистического характера распределения зарядов по молекулам и динамического равновесия нейтрализации и ионизации ионогенных групп во всей популяции молекул лизина она будет выходить из колонки катионообменника со значительной задержкой. В популяции молекул Gly при pH 3,5 подавляющее число молекул электрически нейтрально — они будут слабо задерживаться катионитом, поскольку положительный и отрицательный заряды цвиттериона глицина расположены близко друг к другу. Небольшая часть молекул Gly, обуславливающая все же заметный средний заряд для всей популяции, несет единичный положительный заряд и должна задерживаться на катионите. Но если число таких заряженных молекул невелико, то в силу динамического равновесия ионизации и эквивалентности всех молекул популяции каждая из них пребывает в заряженном состоянии лишь непродолжительное время. Иными словами, вся популяция молекул глицина выйдет из колонки катионообменника с относительно небольшой задержкой. Если окажется, что при pH 3,5 Asp и Gly разделяются недостаточно надежно (поскольку Gly задерживается слабо), то эти аминокислоты наверняка удастся разделить на анионообменнике AG-1 при pH 8,5 (см. рис. 110). Глицин также будет задерживаться незначительно, но зато аспарагиновая кислота должна «сидеть» на анионите прочно и выходить с большой задержкой.

Таким образом, сменив pH буфера и обменник, можно изменить порядок элюции компонентов смеси и характер их разделения.

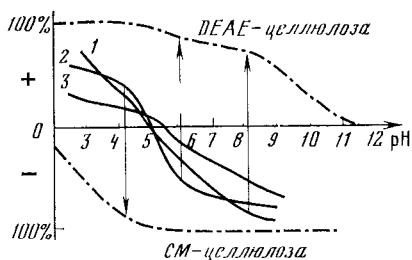
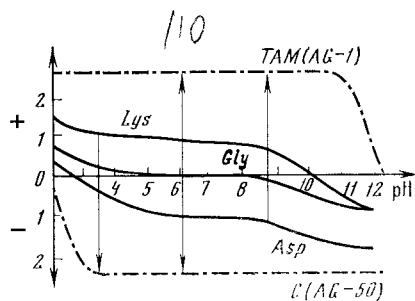


Рис. 110. Кривые титрования растворов лизина, глицина и аспарагиновой кислоты (сплошные линии), а также сильных ионообменников AG-1 и AG-50 (см. рис. 108)

Рис. 111. Кривые титрования трех модельных кислых белков (1—3) и слабых ионообменников DEAE- и CM-целлюлозы (см. рис. 109)

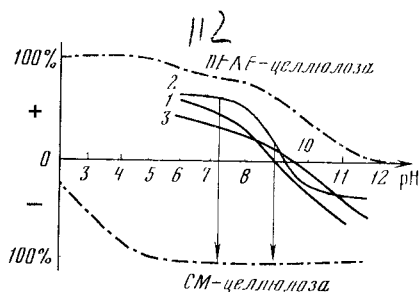


Рис. 112. Кривые титрования трех модельных щелочных белков (1—3) и тех же обменников, что на рис. 111

Можно попробовать разделить все три аминокислоты и при pH 6 на любом из двух ионообменников. Вопрос лишь в том, достаточно ли глицин отстанет от заряженной одноименно с сорбентом и выходящей в свободном объеме колонки аминокислоты. Можно ожидать, что отставание окажется достаточным, во-первых, за счет дополнительного эффекта гель-фильтрации (нейтральный глицин легче входит внутрь гранул, чем одноименно заряженная аминокислота), а, во-вторых, за счет того, что каждый цвиттерион глицина будет все же иногда «цепляться» одним из своих зарядов за противоположные по знаку заряды неподвижных ионов обменника. Тем не менее создается впечатление (его можно проверить на опыте), что условия для фракционирования трех аминокислот в этом модельном эксперименте будут более благоприятными при pH 3,5 или pH 8,5.

Рис. 111 иллюстрирует практически более интересный случай разделения трех кислых белков (1, 2 и 3). Кривые их титрования пересекают ось абсцисс в интервале pH 5,0—5,5. По оси ординат в одинаковом масштабе отложены суммарные заряды белков, а пунктирными линиями изображены кривые ионизации двух слабых ионообменников, перенесенные с рис. 109. Из рис. 111 следует, что разделение кислых белков удобно вести на DEAE-анионообменнике в интервале pH 6—8. И не только потому, что обменник здесь достаточно хорошо заряжен и, следовательно, обладает хорошей емкостью (это, как уже упоминалось, не всегда необходимо и выгодно), а главным образом потому, что в области близких к нейтральному значений pH большинство белков сохраняет свою нативность. Но, приглядевшись к ходу кривых титрования, можно заметить, что выбор pH буфера внутри этого диапазона отнюдь не безразличен. Так, при pH 7 бел-

ки 1 и 2, по-видимому, могут не разделиться — они заряжены оди́наково. При pH 6 имеются явные различия между зарядами всех трех белков. Очевидно, что с анионообменника они будут элюироваться в порядке возрастания среднего отрицательного заряда своих молекул, т. е. в порядке 3—1—2. Между тем при pH 8 (из тех же соображений) белки будут выходить в другом порядке: 3—2—1. Можно и здесь ожидать неплохого разделения трех белков, хотя уместно заметить, что средний отрицательный заряд каждого из них при этом заметно увеличивается, что указывает на опасность многоточечной связи с обменником. Если белки выдерживают закисление до pH 4, то их успешно можно разделить и на СМ-катионообменнике.

Обычно для обеспечения эффективной сорбции белка на ионообменнике и одновременно снижения опасности многоточечной сорбции белка при низкой концентрации соли (<0.01 M NaCl) предпочитают выбирать значение pH, примерно на одну единицу отличающееся от pI белка — разумеется, в ту сторону, которая обеспечивает знак суммарного заряда белка, противоположный знаку зарядов сорбента.

В случае цвиттерионов (например, аминокислот) опасности многоточечной связи не возникает и молекулы устойчивы к экстремальным значениям pH, поэтому выбор pH можно ориентировать на одно из двух значений pK (в кислой или щелочной области), как показал разобранный выше пример.

Рассмотрение кривых титрования щелочных белков (рис. 112) позволяет в результате аналогичных рассуждений прийти к выводу о том, что их удобнее фракционировать на СМ-катионообменнике, опять-таки в интервале близких к нейтральным значений pH. И здесь порядок выхода белков из колонки может зависеть от выбора pH. При pH 7 белки выйдут в последовательности 3—1—2, а для pH 8,6 порядок выхода изменится на 1—3—2.

Разумеется, исследователь редко располагает кривыми титрования всех белков, входящих в состав смеси, и выбор оптимального значения pH производится эмпирически (как описано ниже). Но здесь мы хотели проиллюстрировать то обстоятельство, что подбор оптимального для фракционирования белков значения pH буфера элюции является делом не только очень важным, но и весьма тонким. Отклонение на одну единицу pH в «безобидной» нейтральной области для приведенного выше (вполне реального) примера трех кислых белков могло привести к отсутствию разделения двух из них.

Выбор концентрации соли

Даже при оптимальном pH прочность сорбции вещества сильно зависит от концентрации в элюенте блокирующих заряды ионов соли. При малой их концентрации белок, например даже при двухточечной связи с обменником, практически не будет продвигаться по колонке. При чересчур большой концентрации контрионов белки не будут сорбироваться и быстро, не разделившись, выйдут из колонки. Для промежуточных значений концентрации соли в хроматографической зоне будет иметь место равновесие сорбции и десорбции,

специфическое для каждого из белков, когда часть его молекул будет находиться в подвижной фазе, а другая (желательно большая) часть окажется связанной с обменником. Для каждого значения рН и определенного белка существует зависимость степени его десорбции от концентрации соли, которую можно изучить («снять») экспериментально.

На рис. 113 приведена серия графиков таких зависимостей для пяти белков (1—5). Рассматривая ее, можно заключить, что при

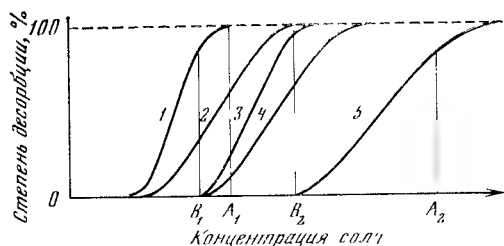


Рис. 113. Кривые десорбции пяти модельных белков (1—5) с ионообменника в зависимости от увеличения концентрации соли в элюенте

изократической элюции концентрацией соли, равной A_1 , можно надеяться разделить белки 1—4. Действительно, белок 1 будет полностью десорбирован и выйдет в свободном объеме колонки. За ним последуют в порядке возрастания прочности сорбции белки 2, 3 и 4. Белок 5 практически не выйдет из исходной зоны нанесения препарата на колонку; его можно снять, увеличив концентрацию соли, например до значения A_2 (ступенчатая элюция). Если окажется, что при концентрации A_1 белки 3 и 4 разделяются плохо, то имеет смысл разбить элюцию на три ступени: начать с концентрации B_1 (она элюирует и разделит белки 1 и 2), затем увеличить ее до B_2 и разделить тем самым белки 3 и 4, а затем концентрацией A_2 снять прочно сорбированный белок 5. Если же и в этом случае получить хорошее разделение не удастся, то следует попытаться провести его при другом значении рН. Кривые десорбции при этом, очевидно, сместятся, а поскольку графики титрования различных белков могут отличаться по крутизне, то и смещение кривых десорбции может оказаться неодинаковым. Не исключено, что при другом значении рН взаимное расположение этих кривых окажется более благоприятным. Кривые десорбции легко «снять» экспериментально (см. ниже), если имеются чистые белки или в составе смеси их можно обнаруживать по биологической активности, специфической цветной реакции или радиоактивности.

Вместо ступенчатой элюции может оказаться целесообразным постепенно увеличивать концентрацию, например от B_1 до A_2 , т. е. перейти на непрерывный (линейный или нелинейный) градиент концентрации соли. Сравнительные достоинства ступенчатой и градиентной элюции рассмотрены в гл. 1.

Можно ступенчато или постепенно изменять и значение рН элюирующего буфера, с тем чтобы, например, ослабить прочность сорбции белка 5, но уже после того, как белки 1—4 выйдут из колонки или

достаточно продвинутся по ней. Это позволит избежать сильного увеличения концентрации соли, если оно нежелательно.

Таким образом, варьируя рН буфера и концентрацию соли, можно подобрать условия для разделения всех белков смеси в одном хроматографическом опыте. Если сделать это не удастся, то неразделившиеся белки можно внести в колонку с другим ионообменником или использовать другой вид хроматографии.

Часто перед исследователем стоит задача очистки одного белка. В этом случае оптимальные условия элюции подбирают так, чтобы все остальные белки, не разделяясь, отходили от нужного белка в ту или другую сторону, т. е. элюировались раньше него или задерживались на колонке.

НЕИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВА И СОРБЕНТА

Помимо описанных ионных взаимодействий, в хроматографическом процессе в большей или меньшей степени участвуют и другие виды взаимодействия вещества с сорбентом, рассмотренные ранее в других хроматографических методах. Свой вклад неизбежно вносят гель-фильтрация, гидрофобное взаимодействие с материалом матрицы, адсорбция за счет водородных связей и ван-дер-ваальсовых сил и, наконец, распределительная хроматография. Последняя, в частности, обусловлена своеобразным явлением распределения ионов соли между подвижной жидкой фазой элюента вне гранул обменника и неподвижной жидкостью внутри гранул. Ионы соли, заряженные одноименно с неподвижными ионами обменника, в определенной степени выталкиваются из гранул, в результате чего концентрация ионов в жидкости внутри и вне гранул может быть не вполне одинаковой. В свою очередь, это вызовет неодинаковость растворимости вещества в двух жидких фазах.

Неионные взаимодействия вещества с обменником, как правило, ухудшают хроматографическое разрешение, «размывают» пики. Их стараются подавить путем соответствующего выбора пористости обменника, введения органических растворителей или мочевины, снижения концентрации соли за счет выбора значения рН, обеспечивающего менее прочную сорбцию вещества, и др.

О том, сколь существенным может быть вмешательство неионных взаимодействий, говорит, например, тот факт, что успешное фракционирование олигонуклеотидов гидролизата РНК на колонках DEAE-целлюлозы стало возможным только после того, как в элюент стали вводить 7 М мочевину [Tomlinson, Tener, 1963].

Но иногда неионные взаимодействия могут и способствовать разделению близких по характеру электрического заряда веществ. Примером может служить описанный ниже метод разделения индивидуальных тРНК на бензоилированной целлюлозе. В этом случае матрицу целлюлозы химически модифицировали таким образом, чтобы сообщить ей определенную гидрофобность. В хроматографии, помимо ионного обмена, участвовало еще и разделение молекул различных тРНК по степени гидрофобности.

ПРИМЕСИ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Такие примеси, нередко присутствующие в продажных препаратах ионообменников, могут блокировать ионы обменника и вещества, препятствуя протеканию нормального ионного обмена. В других случаях тяжелые металлы могут связывать вещество с обменником прочными «мостиками», обуславливая необратимую сорбцию вещества на колонке. Примеси стараются убрать, вводя в элюент ЭДТА или другие хелирующие агенты. Впрочем, иногда такого рода связи удается использовать для целей фракционирования. Существует, хотя и редко используется, так называемая «хроматография обменом лигандов» («ligand exchange»). На хелирующую смолу (типа «Chelex 100») специально «сажают» металлы, способные образовывать координационные комплексы с веществами («лигандами»), например с аминокислотами или белками, которые подают на колонку в составе элюента.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОДАЖНЫХ ИОНООБМЕННИКОВ

Не претендуя на полноту списка, исключительно в целях ориентировки и сопоставления приведем сводку самых необходимых справочных данных о наиболее широко распространенных ионообменниках с указанием основных фирм-поставщиков. Более подробную информацию читатель сможет найти в каталогах этих фирм. В число справочных данных мы включим диапазоны размеров гранул в микрометрах или единицах МЕШ (см. выше), емкость для малых ионов — в миллиэквивалентах (а для глобулярных белков — в миллиграммах) на 1 мл упакованного в колонку набухшего обменника, степень набухания, т. е. объем упакованного обменника, приходящийся на 1 г его в сухом виде, и предел исключения ($M_{\text{искл}}$), т. е. наименьшую массу глобулярного белка, уже не способного проникнуть в поры обменника, — в Дальтонах. Кроме того, там, где это необходимо, в максимально краткой форме отметим индивидуальные особенности ионообменника. Распифровка сокращенных обозначений ионогенных групп (DEAE, CM и др.) была дана в начале этой главы.

ИОНООБМЕННИКИ НА ОСНОВЕ ПОЛИСТИРОЛА (СМОЛЫ)

Фирма «Bio-Rad» выпускает сильные анионообменники типа AG-1 и сильные катионообменники типа AG-50W. Размеры сухих гранул: 100—200, 200—400 и —400 МЕШ. Последняя цифра в наименовании указывает процентное содержание дивинилбензола («спивки»). Объем обменников обоих типов очень мало зависит от pH и ионной силы элюента. Фирмы «BDH» и «Serva» выпускают аналогичные обменники: аниониты типа «Amberlite CG-400» и катиониты типа «Amberlite CG-120».

Марка	Емкость, мэкв/мл	Степень набухания мл/г,	M _{искл}
AG-1 × 2	0,7	5	2700
AG-1 × 4	1,2	3	1400
AG-1 × 8	1,4	2	1000
AG-50W × 2	0,7	7,5	2700
AG-50W × 4	1,2	4,3	1400
AG-50W × 8	1,7	3,0	1000

AGMP-1 и AGMP-50 — макропористые аналоги двух рассмотренных типов смол. Их получают спеканием микрочастиц, между которыми образуются пустоты (поры), занимающие 20—30% объема гранулы, куда могут проникать белки среднего размера ($M_{искл} = 75\,000$). Емкости для малых ионов: 1,2 и 1,7 мэкв/мл. Сорбция белков идет только в пустотах, на поверхности микрочастиц. Диапазон размеров сухих гранул: 100—200 и 200—400 МЕШ.

AG501 × 8 — бифункциональная смола для деионизации растворов. Представляет собой смесь смол типов AG-1 × 8 и AG-50W × 8 соответственно в OH⁻- и H⁺-форме. Диапазон размеров гранул 20—50 МЕШ. AG501 × 8D — то же самое, но с добавкой индикатора насыщения смолы ионами: при насыщении синий цвет смолы сменяется на золотистый. Аналоги: «Amberlite MB1» и «Amberlite MB3».

«Chelex 100» — хелирующая смола, предназначенная для очистки растворов от ионов двухвалентных металлов. Ионогенные группы — иминодиацетат — $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$. Емкость 0,4 мэкв/мл. Поставляется в Na⁺-форме. Избирательность, т. е. отношение уровней сорбции двухвалентных и одновалентных металлов, составляет 5000 : 1.

«Aminex» — сильные ионообменники, предназначенные для использования в аминокислотных анализаторах (катионообменники) и ЖХВД. Имеют сферические гранулы малых размеров с относительно узким диапазоном диаметров. Сорбционные свойства — как у AG-1 и AG-50W. Анионообменники «Aminex» маркируются следующим образом (в скобках — диаметр гранул, мкм): A-14 (17—23; 4% дивинилбензола), A-25 (15—19), A-27 (12—15), A-28 (7—11), A-29 (5—8). Последние четыре марки сшиты 8% дивинилбензола. Аналоги фирмы «Durrum»: DAX8-11 (11 ± 3 мкм) и DAX8-8 (8 ± 2 мкм). Марки катионообменников «Aminex» (8% дивинилбензола) выпускаются с такими диаметрами гранул: A-4 (16—24), A-6 (15—19), A-5 (11—15), A-7 (7—11). Аналоги фирмы «Durrum»: DC-1A (16 ± 3 мкм), DC-6A (11 ± 3 мкм), DC-4A (9 ± 2 мкм). Аналоги фирмы «Beckman»: AA-10 ($9 \pm 0,5$ мкм), W-1 и AA-20.

Отметим, что все ионообменники на основе полистирола отличаются заметной гидрофобностью. При фракционировании белков на обменнике типа AGMP возможна их денатурация.

СМОЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИАКРИЛАТА И ПОЛИМЕТАКРИЛАТА

«Bio-Rex 70» (фирма «Bio-Rad») — крупнопористый слабый катионообменник на основе пемодифицированного полиакрилата, предназначенный для фракционирования пептидов и небольших белков. Гидрофильный катионит, поэтому не опасен в отношении денатурации белка. $M_{\text{искл}} = 75\,000$. Имеет высокую емкость — около 3,3 мэкв/мл.

В 1982 г. фирма «LKB» сообщила о выпуске двух типов очень крупнопористых слабых ионообменников ($M_{\text{искл}} \geq 10^7$) на основе модифицированного полиакрилата («DEAE-Trisacryl M» и «CM-Trisacryl M»). Сферические гранулы диаметром 40—80 мкм обладают достаточной жесткостью, чтобы выдерживать давление 3—4 атм. Емкость по низкомолекулярным ионам — соответственно 0,3 и 0,2 мэкв/мл, по белку — примерно 90—100 мг/мл. Эти ионообменники очень химически стойки: рабочий диапазон pH 0—13. Поставляются они в виде суспензии в 1 M NaCl.

«Spheron» (фирма «Chemapol», Чехословакия) — жесткие крупнопористые смолы на основе полиметакрилата. Средний размер пор — 1000 Å, $M_{\text{искл}} \approx 5 \cdot 10^6$. Эфирной связью через оксиалкильную од-, двух-, четырех- или пятиуглеродную цепочку к матрице присоединяются остатки уксусной кислоты («Spheron C 1000»), сульфокислоты (S 1000), фосфорной кислоты («Phosphate» 1000), диэтиламиноэтил (DEAE 1000) и триэтиламиноэтил (TEAE 1000).

ИОНООБМЕННЫЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Это — очень крупнопористые, относительно мягкие обменники с $M_{\text{искл}} > 10^6$. Они широко используются для хроматографии белков и олигонуклеотидов.

Фирма «Whatman» производит микрогранулированные и волокнистые целлюлозы (см. гл. 2). Емкость обменников первой группы составляет около 0,2 мэкв/мл, или 50—150 мг/мл по белку; степень набухания — около 5 мл/г. Группа включает четыре марки обменников. DE-52 — слабый анионообменник (DEAE), поставляется набухшим, в виде суспензии (ОП-форма). DE-32 — сухой аналог DE-52. CM-52 — слабый катионообменник (CM), поставляется набухшим, в виде суспензии (Na^+ -форма). CM-32 — сухой аналог CM-52. Гидродинамические характеристики: DE-52 допускает скорость течения до 50 мл/см²·ч, CM-52 — до 20 мл/см²·ч при относительном гидравлическом напоре $h/L \approx 10$ (h — разность уровней жидкости, L — длина колонки). При нейтрализации зарядов за счет сдвига pH или введения соли уменьшение объема может достигать до 5%.

По данным фирмы «Pharmacia», скорость течения элюента через колонку, заполненную микрокристаллической целлюлозой, медленно снижается из-за того, что мелкие частицы целлюлозы постепенно смываются из всего объема колонки в нижнюю ее часть, где

образуют «пробку». После нескольких разделений колонку приходится набивать заново («Pharmacia Separation News» N 15, 1980).

Волокнистые целлюлозы поставляются в сухом виде. Степень набухания — 7 мл/г. Марки DE-22 и DE-23 — слабые анионообменники (DEAE). DE-23 освобожден от мелких частиц. Емкость обоих марок составляет 0,15 мэкв/мл (по белку — примерно вдвое ниже, чем у DE-52). Изменение объема при нейтрализации — до 15%. Марки CM-22 и CM-23 — слабые катионообменники (CM). CM-23 освобожден от мелких частиц. Емкость обоих марок — 0,09 мэкв/мл. Изменение объема при нейтрализации еще более значительно — до 30%.

Волокнистые целлюлозы заметно уступают микрогранулярным по качеству разделения — примерно одинаковые результаты фракционирования можно получить на вдвое более коротких колонках, заполненных микрогранулированной целлюлозой. Зато волокнистые целлюлозы позволяют вести элюцию с большой скоростью: при таком же, как выше, относительном гидравлическом напоре ($h/L = 10$) колонки, заполненные DE-23, допускают скорость течения элюента в 200 мл/см²·ч, а заполненные CM-23 — 400 мл/см²·ч.

Кроме того, эта фирма выпускает сильный катионообменник P-11 — фосфоцеллюлозу, которая поставляется в сухом виде. Степень набухания — 5 мл/г. Емкость — 0,75 мэкв/мл при pH < 7 и 1,5 мэкв/мл в щелочной области (из-за диссоциации второго протона остатка фосфорной кислоты). Фирма отмечает, что эфирная связь фосфата с матрицей не очень прочна, поэтому обменник не рекомендуется подвергать воздействию сильных кислот и щелочей; предпочтительно использовать его однократно.

Сухие целлюлозные обменники должны проходить предварительную обработку (преформирование — см. ниже) и «отмучивание» — особенно не освобожденные от мелких частиц марки DE-22 и CM-22. В случае обменника P-11 преформирование должно быть кратким.

Фирма «Pharmacia» выпускает «DEAE-Sephacel» — новый тип слабого анионообменника на основе микрокристаллической, спитой эпихлоргидрином целлюлозы, имеющий вид сферических гранул повышенной жесткости диаметром 40—160 мкм. Эта марка менее склонна к истиранию, чем DE-52. Рабочий диапазон pH — 2—12, емкость — 0,17 мэкв/мл, или 150 мг/мл по БСА, изменение объема при нейтрализации — до 5%. Поставляется в виде суспензии в 20%-ном водном растворе этанола.

Фирма «Bio-Rad» на основе волокнистой целлюлозы производит ионообменники типа «Cellex». Анионит «Cellex D» (DEAE-целлюлоза) выпускается с тремя номинальными значениями емкости (0,05; 0,09 и 0,11 мэкв/мл); степень его набухания — 8 мл/г. Следующие четыре марки обменников имеют такие параметры (первая цифра — емкость, вторая — степень набухания):

«Cellex CM» (CM-целлюлоза) — 0,1 мэкв/мл, 7 мл/г, «Cellex P» (фосфоцеллюлоза) — 0,19; 4,5, «Cellex T» (TEAE-целлюлоза) — 0,09; 6, «Cellex QAE» (QAE-целлюлоза) — 0,1; 8. Отметим, что емкость «Cellex P» значительно меньше, чем у фосфоцеллюлозы P-11.

Два последних типа представляют собой сплывные анионообменники и для хроматографии белков практически не используются.

«Cellex BD» — безоплированная DEAE-целлюлоза, предназначенная специально для фракционирования РНК с использованием гидрофобных взаимодействий. Емкость — 0,025 мэкв/мл, степень набухания — 16 мл/г.

Фирма «Serva» производит ионообменники на основе микрокристаллической целлюлозы типа «Servacel». Марки DEAE 52, DEAE 32, CM 52 и CM 32 аналогичны по своим свойствам ионообменникам фирмы «Whatman» со сходной маркировкой. Обменник «Servacel DEAE 80» выпускается в виде сферических гранул с диаметром 50—200 мкм и в этом смысле является аналогом «DEAE-Sephacel». Ионообменники на основе волокнистой целлюлозы марок DEAE 23 и CM 23 также сходны с обменниками фирмы «Whatman», но «Servacel DEAE 23» выпускается, подобно «Cellex D», с тремя значениями емкости — 0,055; 0,085 и 0,125 мэкв/мл (степень набухания — соответственно 8,5; 7,5 и 6,5 мл/г). Уместно напомнить, что во избежание многоточечной сорбции белка обменнику с пониженной емкостью иногда следует отдать предпочтение. «Servacel SE 23» представляет собой сильный анионообменник (0,045 мэкв/мл; 5,5 мл/г), «Servacel BD» — аналог «Cellex BD».

Кроме этого, фирма «Serva» предлагает три типа специальных обменников. «Servacel PEI» — обменник для фракционирования (и ТСХ) олигонуклеотидов. Полиэтиленмин типа PEI 600 ($M = 30 \div \div 40$ тыс.) адсорбирован в нем на матрице слабо фосфорилированной целлюлозы. Емкость для малых ионов — 0,015 мэкв/мл, степень набухания — 7 мл/г. «Servacel PAB 23» — парааминобензилцеллюлоза, предназначенная для ковалентного присоединения белков и НК по аминок группам после диазотирования обменника (0,02 мэкв/мл; 9 мл/г). «Servacel DHB» — *m*-диоксиборилфениламиноэтилцеллюлоза, специфический сорбент для связывания по *цис*-диольным группам РНК.

Набор ионообменных целлюлоз, аналогичных перечисленным обменникам фирмы «Serva», выпускает венгерская фирма «Реанал». Список наиболее используемых ионообменных целлюлоз завершим тремя марками, выпускаемыми фирмой «Macherey-Nagel» на основе волокнистой целлюлозы типа MN 2100: «Cellulose MN 2100 DEAE», «Cellulose MN 2100 CM», и «Cellulose MN 2100 PEI». В расшифровке эти наименования, очевидно, не нуждаются.

ИОНООБМЕННЫЕ СЕФАДЕКСЫ

Фирма «Pharmacia» выпускает несколько типов ионообменников, полученных модификацией двух типов сефадексов — G-25 и G-50. Модификаторы (ионогенные группы) прочно фиксированы эфирными связями по гидроксилам остатков глюкозы. Наименование ионообменника начинается с типа ионогенной группы, числа 25 или 50 указывают на то, какой из двух сефадексов служил основой, а стоящие перед ними буквы А или С еще раз подчеркивают характер об-

менника (соответственно анионо- или катионообменник). В качестве контрионов для всех анионообменников служат ионы Cl^- , а для катионообменников — Na^+ .

Ниже приведены параметры ионообменных сефадексов для 0,1 М NaCl в качестве элюента (степень набухания здесь сильно зависит от концентрации соли):

Поногенная группа	Тип сефадекса	Емкость		Степень набухания, мл, г
		для ионов макв, мл	для гемоглобина, мг/мл	
DEAE	A-25	0,50	70	7
DEAE	A-50	0,17	250	20
QAE	A-25	0,50	50	6
QAE	A-50	0,10	200	30
CM	C-25	0,56	50	8
CM	C-50	0,17	350	26
SP	C-25	0,30	30	7,5
SP	C-50	0,09	270	25

Предел исключения для всех обменников на основе G-25 равен 30 000, а для всех обменников на основе G-50—200 000 Дальтон. Эти значения заметно выше, чем у исходных сефадексов (5000 для G-25 и 30 000 для G-50), за счет того, что нити декстрана раздвигаются под действием сил отталкивания одноименно заряженных фиксированных ионов.

Сопоставляя параметры ионообменников на основе сефадекса и целлюлозы, можно заметить следующее. Для ионообменных сефадексов типов A-25 и C-25 емкость по низкомолекулярным ионам значительно выше, чем у соответствующих целлюлоз (что для белков может быть и невыгодным ввиду опасности многоточечных связей), а емкость по белку и степень набухания — примерно такие же. Добавим, что изменение объема в зависимости от pH и концентрации соли в элюенте для этих сефадексов невелико. Так, для 0,1 М NaCl увеличение pH от 7 до 10 приводит к уменьшению объема матрицы DEAE-сефадекса A-25 на 7%, а снижение до pH 4 влечет за собой уменьшение объема CM-сефадекса C-25 на 15% (объемы QAE-сефадекса A-25 и SP-сефадекса C-25 остаются неизменными, так как в таком диапазоне pH заряды их ионов не нейтрализуются). При снижении концентрации NaCl от 0,2 М до нуля в области нейтральных значений pH объемы всех сефадексов типов A-25 и C-25 увеличиваются примерно на 10%.

У ионообменных сефадексов типов A-50 и C-50 емкость по низкомолекулярным ионам примерно такая же, как у целлюлоз, а емкость по белку в 2—4 раза выше, чем у микрокристаллических целлюлоз, и в 4—7 раз выше, чем у волокнистых; набухают они тоже примерно в три раза сильнее. Зато зависимости объемов этих сефадексов от pH и ионной силы элюента выражены очень сильно (рис. 114). Обращает

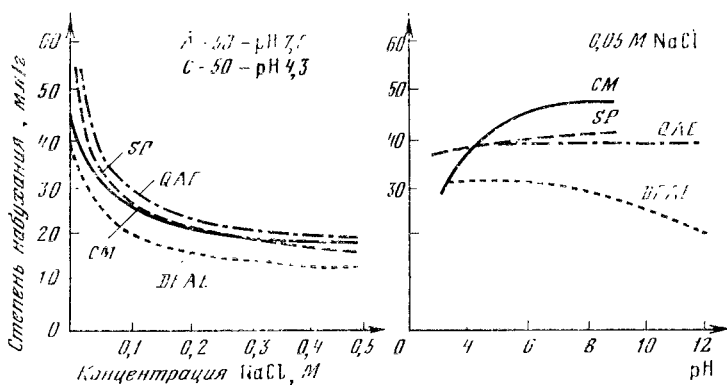


Рис. 114. Изменение степени набухания ионообменных сефадексов в зависимости от концентрации соли в элюенте и его pH

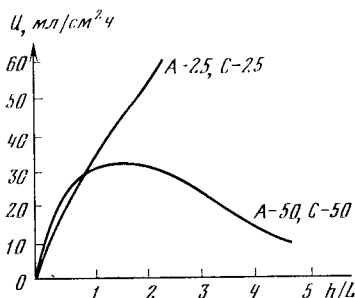


Рис. 115. Зависимость скорости течения элюента (Q) от гидравлического напора (h/L) для ионообменных сефадексов
Размеры колонки $2,5 \times 45$ см;
элюент — 0,1 М NaCl

на себя внимание резкое падение объемов для всех крупнопористых сефадексов при изменении концентрации NaCl в диапазоне 0—0,2 М.

Отсюда можно сделать два практически важных вывода. Во-первых, колонки, заполненные крупнопористыми ионообменными сефадексами, должны быть с самого начала уравновешены элюентом, содержащим не менее 0,1 М NaCl, иначе в ходе элюции с увеличением концентрации соли их объем (высота набивки) может уменьшиться в 2—3 раза, что приведет к существенному ухудшению разрешения пиков. Во-вторых, даже при использовании для элюции солевых растворов с концентрациями в диапазоне 0,1—0,3 М колонка «сожмется» весьма существенно, во всяком случае настолько, что ее уже нельзя будет регенерировать промывкой элюентом с исходной концентрацией соли. При такой промывке столб обменника не сможет подняться до прежнего уровня. Вместо этого увеличивающиеся в объеме гранулы будут деформироваться, утрачивать сферическую форму и заполнять свободные промежутки между ними — протекающие элюента по колонке резко затруднятся. Для регенерации ионообменных сефадексов типов А-50 и С-50 после элюции с увеличением концентрации соли колонки приходится опорожнять и обменники промывать декантацией в свободном объеме.

Механические свойства сефадексов двух категорий пористости тоже существенно различаются (рис. 115). Легко видеть, что для сефадексов А-25 и С-25 скорость течения вплоть до 60 мл/см²·ч почти ли-

нейно зависит от гидравлического напора. Это означает, что их гранулы достаточно жестки и сохраняют свою форму. Совсем иначе обстоит дело для сефадексов А-50 и С-50. Начиная от скорости течения порядка 20 мл/см²·ч, линейность ее зависимости от гидравлического напора явно утрачивается. При дальнейшем увеличении напора скорость перестает расти, а затем начинает падать, что указывает на сжатие обменника и деформацию гранул, заполняющих свободные промежутки между ними.

ИОНООБМЕННИКИ НА ОСНОВЕ АГАРОЗЫ

Фирма «Pharmacia» на основе химически «спитой» сефарозы CL-6В выпускает два слабых ионообменника для хроматографии белков: «DEAE-Sepharose CL-6В» и «CM-Sepharose CL-6В». Их емкость по низкомолекулярным ионам составляет соответственно 0,15 и 0,12 мэquiv/мл, по гемоглобину — примерно 100 мг/мл для обоих обменников. Это сферические жесткие гранулы диаметром 45—165 мкм, крупнопористые ($M_{искл} = 10^6$), химически стойкие, практически не изменяющие своих размеров при изменениях pH и концентрации соли в элюенте. Скорость течения вплоть до 100 мл/см²·ч линейно зависит от гидравлического напора, подаваемого на колонку.

Фирма «Bio-Rad» тоже выпускает два слабых ионообменника на основе агарозы: «DEAE Bio-Gel А» и «CM Bio-Gel А». Их главное отличие от агарозных ионообменников фирмы «Pharmacia» — значительно меньшая емкость: 0,02 мэquiv/мл по низкомолекулярным ионам и 45 мг/мл по гемоглобину (для обоих типов). Для крупных белков уменьшенная емкость может оказаться предпочтительной.

Недавно японская фирма «Toyo Soda» начала выпускать слабые анионообменники типов «TSK-GEL DEAE-Toyopearl 650S» и «...650M». Последняя буква отмечает градацию размера гранул: «S» (superfine) — интервал 20—40 мкм, «M» (medium) — 40—80 мкм. Аналогичные обменники производит фирма «Merck». Это очень жесткие и химически стойкие ионообменники с порами диаметром в несколько тысяч ангстремов, доступные для макромолекул с массами в миллионы Дальтон. Скорость течения элюента через колонку линейно зависит от перепада давлений вплоть до 300 мл/см²·ч. Объем набухшего обменника не изменяется при вариациях pH в интервале 5—10 и концентраций NaCl в интервале 0—0,5 М. Обработка 0,5 н. растворами NaOH и HCl при 25° в течение 10 сут не сказывается на емкости ионообменника. Его можно автоклавировать. Емкость для малых ионов (0,108 мэquiv/мл) — примерно такая же, как у ДЭАЭ-сефарозы и ДЭАЭ-целлюлозы; емкость для крупных белков (например, тиреоглобулина) выше, чем даже у ДЭАЭ-биогеля А. Благодаря повышенной жесткости обменник можно использовать для хроматографии при средних перепадах давлений. Сопоставление профилей разделения белков сыворотки крови и гемоглобинов на различных слабых анионитах позволяет авторам сделать заключение о преимуществе нового обменника [Kato et al., 1982b, c].

Фирма «Serva» выпускает ионообменники на основе крупнопористого силикагеля следующих типов: «Aminopropyl-SP 500», «DEAE-SP 500», «Carboxymethyl-SP 500» и «Carboxypentyl-SP 500».

ИОНООБМЕННИКИ ДЛЯ ЖХВД

Для фракционирования нуклеотидов, аминокислот и коротких пептидов могут быть использованы сильные ионообменники на основе обычных мелкопористых силикагелей. Среди них есть пористые («Partisil-SAX» и «-SCX», «Ultrosil AX» и «CX», «Zorbax SAX» и «SCX», «Nucleosil SB» и «...SA», «Sulfopropyl-Si 100 Polyol») или пленочные («AS Pellionex SAX», «HC Pellionex SCX», «Bondapak AX Corasil» и «...CX Corasil», «Zipax SAX» и «...SCX»). «SAX», «AX» и «SB» обозначают анионообменники, а «SCX», «CX» и «SA» — катионообменники. Фирмы, выпускающие эти обменники, перечислены в табл. 2.

Для фракционирования олигонуклеотидов выпускаются следующие слабые анионообменники: «Lichrosorb NH₂», «Spherisorb NH₂», «Zorbax NH₂», «Nucleosil NH₂» и «...N(CH₃)₂» «Aminopropyl-Si 200 Polyol», «DEAE-Si 100 Polyol» (пористые); «AL-Pellionex WAX», «Poligosil 60-NH₂» (пленочные).

Для фракционирования белков фирма «LKB» недавно начала выпуск крупнопористых слабых ионообменников типа «2133 UltroPak TSK 545 DEAE» и «TSK 535 CM». Обменники поставляются упакованными в колонки двух размеров: 0,75 × 15 см (10 мкм) и 2,15 × 15 см (13 мкм). Для той же цели фирма «Beckman» недавно начала выпуск аналогичных слабых ионообменников: «SpheroGel TSK IHX 530 DEAE» и «...535 DEAE»; «SpheroGel TSK IEX 540CM» и «...545CM». Первые обменники в каждой паре представлены сферическими гранулами диаметром 5 мкм со средним размером пор 130 Å, упакованными в колонку 0,4 × 30 см, вторые — гранулами диаметром 10 мкм и с порами 250 Å в колонках 0,6 × 15 и 2,15 × 15 см. Некоторые примеры использования этих обменников можно найти в бюллетене фирмы «Beckman» № 5914 «HPLC System for proteins, peptides and amino acids». Фирма «Brownlee Labs» на основе силикагеля с порами в 300 Å выпускает анионообменник «Aquapore AX-300», а фирма «Merck» — аналогичный обменник марки «Synchropak AX-300».

ИОНООБМЕННИКИ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ ПРИ УМЕРЕННЫХ ДАВЛЕНИЯХ ФИРМЫ «PHARMACIA»

В гл. 3 при описании аппаратуры для хроматографии уже упоминалось, что в середине 1982 г. фирма «Pharmacia» сообщила о создании принципиально новой системы для ионообменной хроматографии белков при умеренных давлениях, которая получила наименование «Pharmacia FPLC system». Главным фактором, позволившим полу-

чить с помощью этой системы необычайно высокое (по данным рекламных материалов фирмы) качество разрешения белковых пиков при довольно большой скорости элюции, явилась разработка новых жестких, крупнопористых, гидрофильных ионообменников на основе полиэфирной смолы. Поразительной является монодисперсность сферических гранул этих обменников (диаметром 10 мкм), которая была продемонстрирована на рис. 48.

Сообщается о выпуске трех наименований таких ионообменников («MonoBeads»): «Mono Q» (сильный анионообменник), «Mono S» (сильный катионообменник) и «Mono P» (анионообменник, предназначенный специально для хроматофокусирования, с фиксированными на нем буферными группами — такими же, как на агарозном обменнике PBE 94; см. ниже). Ионогенной группой в составе «Mono Q» является $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, «Mono S» — $-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$. Диапазоны емкостей для низкомолекулярных ионов составляют соответственно 0,28—0,36 и 0,13—0,18 мэкв/мл (для «Mono P» — 0,15—0,2 мэкв/мл), для белков с молекулярной массой до 150 000 — 65—80 мг/мл. Все три обменника устойчивы в интервале pH 2—12, а в течение непродолжительного времени — и в интервале pH 1—14.

По размерам пор новые обменники не уступают агарозе, обеспечивая $M_{\text{искл}} = 10^7$ (для глобулярных белков). Изменения pH и ионной силы элюента не вызывают набухания или сжатия гранул. Свободный объем колонки, упакованной монодисперсными сферами, составляет около 40% ее полного объема; ввиду отсутствия мелких гранул колонки, заполненные «Mono Beads», создают малое сопротивление для протекания элюента. Специалисты фирмы утверждают, что белки не обнаруживают каких-либо неспецифических взаимодействий с материалом новой матрицы. Как уже указывалось, новые ионообменники поставляются только в готовых к использованию колонках. Для обеспечения хорошего разрешения белковых пиков рекомендуется загружать эти колонки из расчета не более 5 мг белка на один пик.

ПОДГОТОВКА ОБМЕННИКОВ К НАБИВКЕ В КОЛОНКУ

ПРЕФОРМИРОВАНИЕ И ПРОМЫВКА

Ионообменники на основе агарозы, некоторые типы целлюлозных обменников, «DEAE-Sephacel», «Trisacryl», ряд ионообменников фирмы «Serva» и другие поставляются в набухшем виде, хорошо промытыми и освобожденными от мелких частиц («fines»). Подготовка их к использованию сводится к переводу в нужную ионную форму, т. е. к замене контрионов, однако иногда все-таки проводят дополнительную промывку и «отмучивание». Ионообменники для ЖХВД большей частью поставляются в виде готовых, хорошо промытых колонок.

Сухие обменники (смолы, сефадексы, целлюлозы) для замачивания и набухания засыпают тонкой струйкой с перемешиванием в 10—15 объемов воды или слабого солевого раствора и оставляют для набухания (смолы — на 3 ч, целлюлозы — на 1 ч, сефадексы — на двое суток или на 2 ч в кипящей бане). В начале набухания целесообразно удалить воздух из внутреннего объема гранул кратковременной деаэрацией в колбе Бунзена (если набухание сефадекса идет на кипящей бане, то в этом нет нужды). При всех операциях следует избегать энергичного перемешивания; пользоваться магнитной мешалкой во избежание истирания гранул обменника не следует.

В гл. 2 была пояснена необходимость преформирования («pre-cusling») сухих обменников на основе целлюлозы. Напомним, что речь идет о необходимости разорвать «лишние» водородные связи, которые образуются между нитями целлюлозы при высушивании. Этот разрыв осуществляется за счет сил отталкивания одноименно заряженных ионов обменника. Для преформирования анионообменные целлюлозы переводят в 15 объемов 0,5 М HCl, а катионообменные — в такой же объем 0,5 М NaOH. Этим обеспечивается максимальная ионизация их ионогенных групп. Через 30 мин обменники декантацией или на фильтре промывают водой соответственно до pH 4 или pH 8. Не следует пытаться отмыть обменник водой до pH 7. Ионы OH^- и H^+ из воды будут поочередно замещать контрионы Cl^- и Na^+ , за счет чего слабокислое или слабощелочное значение pH промывной воды будет поддерживаться. За промывкой следует второй этап обработки: на этот раз, тоже на 30 мин, в 0,5 М NaOH помещают анионообменник, а в 0,5 М HCl — катионообменник. Такую операцию полезно повторить со свежей порцией щелочи или кислоты, а затем уже промыть обменник водой до тех пор, пока pH промывки не станет близким к нейтральному. Так заканчивается преформирование. В результате анионообменник оказывается в OH^- -форме, а катионообменник — в H^+ -форме (OH^- и H^+ служат контрионами). Из этих форм ионообменники легко перевести в любую другую нужную форму. Напомним, что фосфоцеллюлозу следует преформировать ускоренно, по сокращенной программе, из-за возможности частично-го гидролиза не очень прочной эфирной связи фосфата.

Смолы и сефадексы преформировать не нужно, но промыть их в случае ответственных опытов имеет смысл. От окраски и органических примесей их можно промыть спиртом и ацетоном, а затем щелочью максимально допустимой концентрации (2 н. для смол и 0,2 н. для сефадексов). Промывку удобно вести на стеклянном фильтре, время от времени взмучивая суспензию стеклянной палочкой. Затем следует промывка водой, а для катионообменников — кислотой и снова водой.

ПЕРЕВОД В НУЖНУЮ ИОННУЮ ФОРМУ

При суспендировании ионообменника в воде или водном растворе соли pH этого раствора может заметно отклониться от нейтрального значения. Очевидно, что анионообменники в OH^- -форме и катионо-

обменники в H^+ -форме соответственно защелачивают или закисляют раствор за счет диссоциации своих контрионов. Менее очевидно, что ионообменники в иных формах тоже изменяют pH раствора, причем в обратном направлении: при суспендировании анионообменника в Cl^- -форме раствор закисляется, а катионообменник в Na^+ -форме раствор защелачивает. Это происходит потому, что диссоциирующие от обменника Cl^- и Na^+ частично замещаются ионами OH^- и H^+ из воды. Разумеется, если ионообменник суспендируют не в воде, а в буфере, то это препятствует изменению pH, однако буферной емкости может и не хватить. Полезно обратить внимание на то, что концентрация ионов (и контрионов) в обменнике очень высока: 1 экв/мл соответствует концентрации 1 М. Вот почему уравнивание обменника буфером элюента требует многократной смены этого буфера, т. е. промывки им обменника.

Если в элюенте предполагается использовать такие же контрионы, какие содержал исходный ионообменник, то для подавления описанного сдвига pH достаточно суспендировать обменник в буфере элюента, подтитровать суспензию щелочной или кислой компонентой буфера и несколько раз промыть обменник на фильтре буфером, до тех пор пока pH не перестанет изменяться в ходе промывки. Проверку такой неизменности следует провести еще раз после длительного, например в течение ночи, выстаивания уравновешенного ионообменника.

Если же в выбранном для элюции буфере фигурирует иной контрион, то еще до загрузки в колонку обменник необходимо перевести в форму, отвечающую выбору буфера, т. е. сменить контрион. В тех случаях, когда производится замена на более активный контрион (ряд активностей контрионов приведен выше), входящий в состав полностью диссоциированной кислоты, щелочи или соли, то она переводится легко. Например, для перевода обменника из H^+ - в Na^+ -форму достаточно медленно промыть его на фильтре двумя объемами допустимо крепкого (0,1—1 н.) NaOH, а для перевода из OH^- - в Cl^- -форму — воспользоваться аналогичной промывкой HCl. Такие варианты перевода удобны еще и тем, что выходящие в раствор контрионы H^+ и OH^- немедленно нейтрализуются. Впрочем, с таким же успехом в обоих случаях можно промывать обменник крепким раствором NaCl до тех пор, пока закисление или защелачивание раствора не прекратится.

В тех случаях, когда в результате перевода в другую форму менее активный контрион должен вытеснить с обменника более активный, промывать приходится долго, пропуская через обменник до 30 объемов раствора хорошо диссоциированного вещества, например NaOH при переводе анионообменника из Cl^- - в OH^- -форму. Критерием окончания перевода в данном случае может служить исчезновение Cl^- в промывных водах, что легко проверить методом осаждения 1 %-ным раствором $AgNO_3$. Если замещающий контрион входит в состав относительно слабо диссоциирующей кислоты, например при переводе обменника в формиатную форму, то промывать следует крепким раствором соли этой кислоты (2М $HCOONa$). Если исходно

ионообменник был в OH^- -форме, то в промывку следует ввести 1M HCOOH для нейтрализации зашлакавания раствора. Даже с помощью соли перевод анионообменника из Cl^- -формы в формиатную или ацетатную происходит с трудом. Для смол выгоднее осуществить перевод в два этапа: сначала с помощью крепкой щелочи перевести обменник в OH^- -форму, а из нее уже в формиатную или ацетатную комбинацией соли и кислоты.

Слабые катионообменники особенно трудно перевести из H^+ -формы в другую, так как остаток уксусной кислоты на обменнике плохо диссоциирует (приходится выдерживать в щелочи не менее суток). Поэтому карбоксиметилцеллюлозу и CM-сефадекс поставляют всегда в Na^+ -форме.

Если для смены контриона использование сильной кислоты, щелочи или соли нежелательно и надо пользоваться только буфером, то для ускорения всей процедуры можно начать промывку буфером высокой, например 10-кратной, концентрации и уже после окончания смены контриона уравновесить колонку исходным буфером для элюции. Показателем окончания смены контриона при промывке буфером может служить равенство значений его pH до и после промывки обменника, если он был исходно в OH^- - или H^+ -форме, или равенство электропроводностей, если он был в Cl^- - или Na^+ -форме.

ОПАСНОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ CO_2

К такому поглощению особенно склонны анионообменники в OH^- -форме. Образующийся при растворении CO_2 в воде ион бикарбоната HCO_3^- , стоящий в ряду активности контрионов вслед за Cl^- , легко связывается с обменником в качестве контриона, вытесняя OH^- (и тем самым способствуя дальнейшему растворению CO_2). Связанный с обменником HCO_3^- не только затрудняет дальнейший обмен ионов, но и (что еще хуже), выходя в ходе обмена обратно в элюент, образует угольную кислоту, легко разлагающуюся на H_2O и CO_2 . Если это происходит уже в колонке, то пузырьки углекислого газа застревают в гранулах, существенным образом препятствуя диффузии молекул вещества и ухудшая разрешение пиков. При длительном контакте суспензии ионообменника с воздухом таким образом может быть захвачено значительное количество CO_2 . По этой причине анионообменники перед уравниванием или переводом в другую форму следует деаэрировать при $\text{pH} < 4,5$, используя для подкисления раствора кислую компоненту буфера. Затем суспензию можно оттитровать до нужного значения pH щелочной компонентой буфера и затем уже промывать или уравнивать растворами, приготовленными на кипяченой воде. На такой же воде следует готовить и элюент. Подготовленный обменник следует вносить в колонку без промедления.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Способы набивки колонки, ее уравнивания прокачкой исходного элюента, внесения препарата, а также варианты и методы осуществления элюции подробно описаны в дд. 3. Однако следует отметить некоторые особенности, присущие использованию ионообменников. Главная из них связана с возможностью изменения объема обменника (высоты его столба в колонке) при изменении рН и концентрации соли в ходе элюции, особенно для ионообменных сефадексов типов А-50 и С-50. В связи с этим использование адаптора может оказаться неуместным, так что препарат приходится вносить в открытую колонку. Поверхность ионообменника в таком случае иногда защищают от взмучивания слоем сефадекса G-25 толщиной около 5 мм или кружком фильтровальной бумаги (следует убедиться, что препарат не сорбируется на нем). В ответственных случаях фракционирования препарат имеет смысл подслаивать под буфер, как было описано в гл. 3. Следует помнить, что ионообменные сефадексы типов А-50 и С-50 гораздо мягче, чем сам сефадекс G-50. Их следует набивать в колонку с теми же предосторожностями, что были описаны в гл. 4 для сефадекса G-100.

Проверку качества набивки колонки с анионообменником нельзя вести с помощью голубого декстрана, как рекомендовалось для гelfильтрации, так как голубой декстран на нем сорбируется. Его следует заменить раствором щелочного красителя, например малахитового зеленого. Для катионообменников рекомендуется использовать кислый краситель (например, кислый оранжевый II).

ВЫБОР УСЛОВИЙ СТАТИЧЕСКОЙ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Следует различать статический и динамический варианты ионообменной хроматографии. Статическим будем называть разделение исходной смеси веществ на ионообменнике путем смены равновесных состояний, когда компоненты смеси практически поочередно полностью десорбируются и вымываются элюентом в объеме или на коротких колонках, а динамическим — истинно хроматографическое разделение, когда все компоненты смеси в виде хроматографических зон мигрируют вдоль колонки и разделяются за счет различия скоростей этой миграции. Начнем рассмотрение с описания наиболее распространенных случаев использования и способов осуществления статического варианта.

НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ ЩЕЛОЧИ ИЛИ КИСЛОТЫ БЕЗ ОБРАЗОВАНИЯ СОЛИ

Если, например, необходимо нейтрализовать раствор, содержащий нуклеотиды после щелочного гидролиза РНК, то это нельзя делать добавлением кислоты, так как образующаяся соль помешает дальнейшему фракционированию нуклеотидов. Вместо добавления кис-

лоты можно суспендировать в растворе катионообменник в H^+ -форме, например AG-50W (H^+). Если обменник внести в избытке, то практически все ионы Na^+ или K^+ , принадлежащие щелочи, сорбируются на колонку и вытеснят с нее ионы H^+ в количестве, точно соответствующем полной нейтрализации гидроксидов щелочи. Смолу следует добавлять порциями, перемешивая и продолжая следить за pH раствора вплоть до полной его нейтрализации. По емкости смолы и концентрации щелочи можно подсчитать предварительно, какое минимальное количество смолы должно потребоваться для нейтрализации. Некоторый ее избыток не повредит делу; более того, его имеет смысл внести для скорости и полноты обмена. Нуклеотиды не будут сорбироваться на катионообменнике, поэтому их раствор легко отделить от обменника декантацией, промывкой водой на фильтре или элюцией из маленькой колонки, куда можно перенести суспензию.

Точно так же можно нейтрализовать раствор кислоты с помощью анионообменника в OH^- -форме, например AG1 $\times$ 8(OH^-). Разумеется, если таким образом осуществляется нейтрализация продуктов кислого гидролиза, то надо быть уверенным, что сами они не сорбируются на анионообменник.

ЗАМЕНА ИОНОВ

Для замены одного из ионов соли на другой, как и в предыдущем случае, следует обработать раствор (или суспензию) соли большим, например 10-кратным по емкости, избытком смолы, несущей нужную замену в качестве контриона. Существенно, что таким образом можно заменять и ионы нерастворимых солей, превращая их в растворимые. Например, полученные в осадке (или продажные) бариевые соли нуклеотидов можно перевести в натриевые или калиевые соли с помощью AG-50W (Na^+) или AG-50W (K^+). Дело в том, что «нерастворимость» — это просто очень плохая растворимость (некоторая, очень малая доля нерастворимой соли находится в растворе и в равновесии со всей массой осадка). Благодаря переходу иона, определяющего нерастворимость (например, Ba^{2+}), из этой растворенной доли на смолу равновесие все время смещается, поэтому осадок быстро растворяется полностью. Заключительный этап вымывания растворенных солей водой (или буфером) удобно вести в небольшой колонке.

ОБЕССОЛНВАНИЕ РАСТВОРОВ

Операцию одновременного удаления из раствора катиона и аниона соли можно осуществить с помощью смеси анионообменника в OH^- -форме и катионообменника в H^+ -форме. Готовые смеси такого рода были упомянуты выше (AG-501 $\times$ 8, «Amberlite MB1»). Обычно их берут с большим избытком, а заполненные колонки используют многократно, до полного насыщения емкости смолы, что при наличии

подмешанного к смоле индикатора обнаруживается по изменению ее цвета. Солевой раствор очищаемого вещества пропускают через такую колонку. Разумеется, при этом надо быть уверенным в том, что само вещество не будет сорбироваться на смоле, как, например, в случае электрически нейтральной мочевины.

Интересно отметить, что на бифункциональной смоле AG-501 $\times$ 8 можно очищать белки от амфилинов после электрофокусирования и элюции из геля. В растворе небольшой ионной силы белки лишь незначительно задерживаются и полностью вымываются из колонки, в то время как амфилины сорбируются на ней прочно. По-видимому, это следует объяснить тем, что белок несет на своей поверхности заряды обоих знаков, так что одновременно с притяжением на одних участках на других действуют силы отталкивания от одноименно заряженных ионов смолы [Baumann, Chrambach, 1975].

Для обессоливания амфотерных веществ или цвиттерионов можно воспользоваться следующим приемом. На небольшую колонку сильного катионообменника в H^+ -форме или анионообменника в OH^- -форме подают солевой раствор вещества, установив pH раствора таким образом, чтобы вещество сорбировалось на смоле. Вместе с ним будут сорбироваться и ионы того же знака, а ионы противоположного знака выйдут из колонки. Затем буфер меняют так, что заряд амфотерного вещества изменяется на противоположный и оно элюируется. При этом ионы соли остаются сорбированными в колонке. Следует только иметь в виду, что при посадке вещества на колонку в элюент выходят контрионы H^+ или OH^- и раствор соответственно закисляется или защелачивается. Если это представляется опасным для вещества, то лучше перевести смолу в форму с летучим контрионом, который потом можно будет легко удалить упариванием. Например, щелочные пептиды (богатые Arg и Lys) удобно обессоливать на AG-50 W (NH_4^+). Элюировать их можно слабощелочным формиатно-аммониевым буфером. Кислые пептиды (богатые Asp и Glu) можно обессоливать на AG-1 ($HCOO^-$) и элюировать таким же по составу, но слабокислым буфером.

Нуклеотиды и олигонуклеотиды удобно обессоливать на слабом анионообменнике (DEAE) в бикарбонатной форме и элюировать триэтиламмонийбикарбонатным буфером, который потом легко упарить. Хотя полной перезарядки олигонуклеотидов достигнуть и не удается, но с DEAE-обменника они элюируются в то время, когда ион Cl^- , например, остается еще связанным с колонкой.

УДАЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ

Помимо очевидного способа очистки амфотерного вещества или цвиттериона от электрической нейтральной примеси путем сорбции этого вещества на ионообменник и промывки на нем, упомянем еще две возможности, связанные с тем, что альдегиды задерживаются

на сильных анионообменниках типа AG-1, а гликоли (например, глицерин) с ионом борной кислоты образуют кислые комплексы, которые тоже задерживаются на сильных анионообменниках.

КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Из разбавленного раствора вещество сорбируют на небольшой колонке сильного ионообменника, а затем снимают («выбивают») его малым объемом концентрированного раствора вытесняющего иона или резким изменением pH. При сорбции вещества на ионообменнике решающую роль играет концентрация конкурирующих ионов, а объем исходного раствора вовсе не играет роли. Поэтому нередко перед концентрированием раствора амфолита (особенно после предшествовавшей стадии хроматографической очистки, на которой элюцию проводили солевым раствором) препарат приходится еще разбавлять (нередко в 10 и более раз) водой или слабым буфером и в таком виде сорбировать на концентрирующую ионообменную колонку. Хотя объем препарата при этом может во много раз превышать объем колонки, вещество сорбируется тонким слоем в верхней ее части, откуда затем «выбивается» малым объемом нередко той же самой соли и в той же концентрации, что была в растворе препарата до его разбавления. Сущность эффекта разбавления состоит в том, что каждая молекула вещества в своей конкуренции с ионами соли за связывание с обменником выступает независимо от других таких же молекул, в то время как ионы соли способны помешать ее сорбции только в своей совокупности, т. е. при концентрации, достаточной для надежного блокирования ионов сорбента.

РАЗДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ СМЕСИ, СИЛЬНО РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СРОДСТВУ К ОБМЕННИКУ

К статическому варианту хроматографии относится и тот широко распространенный случай, когда подбирают такие условия сорбции смеси компонентов на ионообменнике, что часть из них сорбируется почти полностью, в то время как другая часть практически не сорбируется. Учитывая равновесный характер процессов сорбции—десорбции, такое кардинальное различие поведения возможно для двух компонентов (или двух групп компонентов) смеси, сильно отличающихся друг от друга по сродству к сорбенту в данных условиях. Крайний случай такого отличия — противоположные знаки суммарных электрических зарядов. Чаще всего такие условия удается подобрать для относительно слабых ионообменников. Плохо сорбируемые вещества извлекают декантацией в объеме или промывкой колонки, хорошо сорбируемые — последующей элюцией при резкой смене условий сорбции.

Общий признак всех вариантов статической ионообменной хроматографии — установление равновесного распределения веществ меж-

ду фазами, осуществляемое одновременно для всего объема сорбента и всего препарата в свободном объеме или на небольшой колонке. Суммарная эффективная емкость обменника берется обычно с изрядным избытком, но все же она того же порядка, что и количество вещества в препарате. Равновесные процессы распределения компонентов системы обычно сдвинуты в крайние положения: полностью сорбируются или практически не сорбируются. При резком изменении условий элюции эти равновесия нередко меняются на обратные (например, вместо полной сорбции — полная десорбция). Этому обычно предшествует промывка обменника от не сорбировавшихся на предыдущем этапе компонентов.

Для изменения ионного состава среды, в которой растворены низкомолекулярные вещества, или для их статического фракционирования удобно пользоваться сильными ионообменными смолами. Для обработки биополимеров предпочтение следует отдать слабым крупнопористым обменникам на основе целлюлозы, декстрана или агарозы, за исключением того случая, когда биополимер должен, не задерживаясь на колонке, выйти в ее свободном объеме, оставив за собой сорбированные низкомолекулярные примеси. В этом случае удобно воспользоваться смолой.

Хроматография в объеме уступает в эффективности колоночной хроматографии (даже в статическом варианте), но зато проще и удобнее для больших количеств вещества. Кроме того, не возникает проблемы сжатия и деформации обменника при любых изменениях pH и ионной силы элюента. Хроматография в объеме начинается с уравновешивания обменника в исходном буфере для сорбции препарата. Затем раствор последнего добавляют к суспензии обменника и время от времени осторожно перемешивают в течение часа. Сорбент промывают на фильтре исходным буфером и переносят обратно в стакан, где точно так же осуществляют элюцию — периодическим перемешиванием в элюирующем растворе с последующей промывкой на фильтре.

ВЫБОР УСЛОВИЙ ДИНАМИЧЕСКОЙ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Общему физическому рассмотрению этого процесса была посвящена гл. I. Здесь мы рассмотрим особенности его подготовки и осуществления в случае ионообменной хроматографии.

Прежде всего надо постараться составить себе по возможности полное представление о самом препарате, т. е. найти ответы на следующие вопросы:

1. Какие компоненты смеси веществ представляют интерес и подлежат фракционированию или очистке?
2. В каком интервале лежат молекулярные массы фракционируемых компонентов, в том числе и тех, от которых надлежит освободиться?
3. Каковы, хотя бы ориентировочно, значения изоэлектрических точек (pI) для всех компонентов смеси (или pK для ионов), в какой

диапазон рН они укладываются? Какие еще различия между ними можно использовать для фракционирования (в степени гидрофобности, растворимости и др.)?

4. Что известно о лабильности каждого из очищаемых компонентов смеси? Каков в этой связи допустимый диапазон изменения рН, температуры, имеется ли необходимость введения в элюент глицерина, β -меркаптоэтанола или его аналогов, а также неионных детергентов?

5. Имеется ли опасность агрегации, выпадения в осадок, неспецифической сорбции веществ на материале матрицы? Следует ли вводить в элюент какие-либо добавки, препятствующие развитию этих явлений, например мочевины, соль, детергенты или органические растворители?

6. В каком виде желательно получить разделенные фракции (т. е. допустимое разбавление вещества, концентрация соли, использование летучих буферов и солей и др.)?

Далеко не на все эти вопросы у исследователя имеются вполне определенные ответы, но нередко для ориентировки можно опереться на аналогию с хорошо известными веществами. Некоторые вопросы можно выяснить в ходе специальных предварительных опытов, как описано ниже. После того как составлено максимально полное представление о препарате, можно приступать к «конструированию» самой хроматографической системы.

ВЫБОР ИОНООБМЕННИКА

Выбор типа обменника целесообразно начать с его *пористости*. Для низкомолекулярных соединений (аминокислот, нуклеотидов, коротких пептидов и олигонуклеотидов) удобно использовать ионообменные смолы на основе полистирола. Для особо «тонких» случаев фракционирования, когда размеры гранул (и особенно их разброс) желательно свести до минимума, выбирают обменник типа «Aminex». Для более крупных полипептидов и полинуклеотидов с молекулярной массой менее 10 000 можно использовать ионообменные сефадексы типов А-25 и С-25. Сравнительно небольшие белки удобно фракционировать на смоле «Bio-Rex 70». Для фракционирования и очистки белков имеется большой выбор крупнопористых обменников: ионообменные целлюлозы, сефадексы типов А-50 и С-50 (для $M < 100\,000$), ионообменники на основе агарозы, обменники типа «DEAE-Trisacryl M», «CM-Trisacryl M» и «Spheron». То же самое относится к фракционированию нуклеиновых кислот малого размера или их фрагментов (высокомолекулярные НК фракционировать методом ионообменной хроматографии не удастся из-за их чересчур прочного, многоточечного, связывания с обменником). Фракционирование и очистку особо крупных молекулярных агрегатов и вирусов с молекулярной массой более $4 \cdot 10^6$ приходится вести на поверхности гранул, для чего можно использовать ионообменные сефадексы типов А-25 и С-25 или даже смолы.

Все перечисленное относилось к хроматографии при низком дав-

лении. Для ЖХВД малых молекул используются ионообменники на основе обычных, относительно мелкопористых силикагелей; для белков можно рекомендовать недавно появившиеся ионообменники типов «Ultrapak TSK» фирмы «LKB» и «Spherogel TSK IEX» фирмы «Beckman». Особое место, как отмечалось, занимает перспектива использования для фракционирования белков при умеренных давлениях новых ионообменников типа «Mono Beads» фирмы «Pharmacia».

Далее следует сделать выбор между *анионо-* и *катионообменником*. При фракционировании определенным образом заряженных молекул такой выбор не представляет труда. Например, очевидно, что олигонуклеотиды следует делить на анионообменнике, а заведомо щелочные белки, например гистоны, — на катионообменнике. Для амфотерных молекул посредством выбора рН буфера можно задавать знак суммарного заряда и таким образом определять нужный тип ионообменника. Здесь решающим соображением может оказаться учет диапазона рН, в котором препарат (например, белок) сохраняет свою нативность, не склонен к агрегации или неспецифической сорбции. Если такой диапазон рН располагается по обе стороны от изоэлектрической точки очищаемого компонента исходной смеси, то выбор типа обменника может диктоваться оптимизацией условий разделения, как было пояснено выше, в разделе «Хроматографический процесс».

Следующий этап — выбор между *сильным* и *слабым* ионообменником. Для низкомолекулярных ионов и цвиттерионов предпочтение, как правило, следует отдать сильным ионообменным мелкопористым смолам высокой емкости. Для биополимеров, с их склонностью образовывать многоточечные связи с обменником, предпочтение следует отдать слабому ионообменнику. Даже если биополимер и удастся элюировать с сильного ионообменника, то приходится использовать очень высокие концентрации соли, что, как правило, неудобно для его последующей очистки или исследования. Об опасности многоточечных связей биополимера с обменником в свете возможности его денатурации было сказано достаточно.

Чем крупнее молекула белка, т. е. чем больше вероятность ее многоточечного связывания, тем меньшей должна быть *емкость* (по низкомолекулярным ионам) выбираемого обменника. Ионообменники на основе целлюлозы и агарозы имеют меньшую емкость, чем ионообменные сефадексы. Емкость агарозных обменников фирмы «Bio-Rad» в несколько раз меньше, чем у аналогичных ионообменников фирмы «Pharmacia». Напомним также, что анионообменники на основе целлюлозы типов «Cellex D» (фирмы «Bio-Rad») и «Servacell DEAE-23» выпускаются с тремя значениями емкости, а для слабых катионообменников тех же фирм градация емкости не предусмотрена. Это, по-видимому, связано с тем, что в подавляющем большинстве случаев со сложными белковыми смесями (когда избежать многоточечного контакта для всех компонентов особенно трудно) на первых этапах фракционирования приходится иметь дело при очистке кислых белков цитоплазмы, заряженных отрицательно в диапазоне рН, отвечающем их нативности,

Волокнистые целлюлозы с их лучшими гидродинамическими характеристиками более удобны на этих ранних этапах, когда экстракты вязки, объем их достаточно велик, а качество разделения фракций может быть еще не очень высоким. Микрогранулированные целлюлозы, дающие примерно вдвое лучшие разрешения, чем волокнистые, следует предпочесть на более поздних этапах очистки белка.

Как уже подчеркивалось, во всех этих оценках фигурирует «паспортная» емкость обменника для низкомолекулярных ионов.

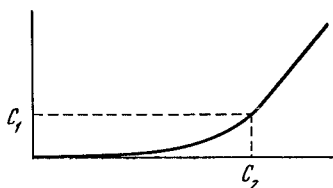


Рис. 116. График для определения полной эффективной емкости обменника для данного биополимера (см. текст)

Для определения необходимого количества обменника полезно определить его фактическую емкость для данного биополимера (приводимые иногда «паспортные» данные для гемоглобина могут служить лишь для очень грубой ориентировки). С этой целью можно поступить следующим образом. 50 мг обменника суспендируют в 10 мл буфера (0,1 М) при значении рН, гарантирующем полную сорбцию, добавляют определенными порциями раствор биополимера, перемешивают каждый раз в течение 10 мин и определяют (например, по УФ-поглощению) концентрацию биополимера в отстое (C_1). По известному суммарному количеству добавленного вещества и объему суспензии подсчитывают полную «концентрацию» вещества в этом объеме (C_2) и строят график зависимости $C_1 = f(C_2)$, как показано на рис. 116. Выход зависимости на прямую линию, идущую под углом 45° , указывает момент насыщения обменника. Фактическую его емкость для данного биополимера (E) можно подсчитать по формуле

$$E = \frac{(C_2 - C_1) V}{v},$$

где V — объем суспензии, а v — объем упакованного обменника.

Для сефадексов типов А-50 и С-50 эта величина может достигать соответственно до 200 и 350 мг/мл, чему отвечает связывание до 6 и 9 г белка на 1 г сухого обменника (отсюда следует экономичность использования этих сефадексов для первоначальной грубой очистки белка в объеме). Для ионообменных целлюлоз отношение масс белка и сухого обменника составляет примерно 1 : 1.

При выборе обменника решающую роль могут иногда сыграть факторы, на первый взгляд второстепенные. Например, жесткость обменника и сохранение объема при изменениях рН и ионной силы элюента могут играть очень важную роль в случае разделения смеси компонентов, сильно различающихся между собой по сродству к обменнику, когда для элюции может оказаться необходимым использование широкого диапазона концентраций соли или рН буфера.

Еще один фактор, который надо иметь в виду при выборе обменника, — опасность неспецифической сорбции вещества на материале матрицы. Например, если молекулы вещества заметно гидрофобны, то от использования крупнопористой полистирольной смолы типа AG-MP следует отказаться в пользу смолы «Bio-Rex 70» или обменника на основе целлюлозы. Агарозные ионообменники также имеют определенную склонность к гидрофобным взаимодействиям с веществом. Впрочем, уже отмечалось, что подобные взаимодействия иногда могут и участвовать во фракционировании. Так, пурины намного прочнее сорбируются на полистирольных смолах, чем пиримидины, при одинаковых средних зарядах, а успехи в разделении различных тРНК были достигнуты именно благодаря использованию наряду с ионным обменом гидрофобных сил взаимодействия с матрицами типа «BD-cellulose» и «Amberlyste A-21». Сорбция вещества на матрице может происходить и за счет водородных связей и вандер-ваальсовых сил взаимодействия. Если для подавления сорбции в элюент вводят мочевины, то ее следует надежно очистить от примесей цианата, способного модифицировать белки.

ВЫБОР ТИПА ЭЛЮЦИИ

Для разделения близких по своим хроматографическим свойствам веществ используют изократическую элюцию — раствором неизменного состава. Этот вариант элюции дает наилучшее разрешение пиков, однако нередко — за счет увеличения длительности хроматографии и объема разделяемых фракций по сравнению с градиентными методами элюции. Объем препарата при изократической элюции не должен превышать 1—5% объема колонки, так как вещество в этом случае, сорбируясь не слишком прочно, не будет существенно концентрироваться в верхней части колонки во время сорбции.

Элюцию ступенчатым или непрерывным градиентом осуществляют чаще всего за счет изменения концентрации соли в буфере неизменного состава. Изменение pH буфера используют, как правило, для ступенчатого градиента с целью нейтрализации, а иногда и изменения знака заряда компонентов фракционируемой смеси или нейтрализации самого обменника. Условия посадки препарата на колонку при градиентной элюции обычно бывают таковы, что он концентрируется в верхней части колонки (начальные значения коэффициентов распределения велики). В силу этого объем препарата роли не играет и может быть значительным. Загрузка не должна превышать 5—10% от фактической емкости колонки для данного вещества. Исходя из этого можно рассчитать необходимое количество набухшего сорбента. В случае ступенчатого градиента загрузка может быть выше, приближаясь к 100% при переходе к статическому варианту хроматографии.

ВЫБОР pH БУФЕРА ДЛЯ ЭЛЮЦИИ

Для низкомолекулярных ионов и цвиттерионов этот выбор очень строг — достаточно обеспечить нужный заряд вещества. Элюцию с сильных анионообменников кислотных по своей природе веществ (например, нуклеотидов) удобно производить с помощью HCl. Ион Cl^- эффективно вытесняет с сорбента кислотный остаток, а ион H^+ его нейтрализует. Вещества основного характера по аналогичной причине удобно элюировать NaOH или KOH.

Если элюент должен состояться на основе буфера, то, помимо соответствия диапазона буферной емкости нужному значению pH, необходимо обдумать выбор химической природы буфера в связи с возможностью его взаимодействия с обменником. В состав любого буфера входит обеспечивающий само явление буферности неполностью диссоциированный остаток слабой кислоты или слабого основания. Если такой остаток (в диссоциированной форме) сорбируется на обменнике, то буферное равновесие нарушается и изменяется pH. Во избежание этого хроматографию на анионообменниках предпочтительно вести в таких буферах, у которых буферный компонент является катионом, т. е. в трисовом, пиридиновом или имидазольном, а для катионообменников следует использовать такие буферы, как ацетатный, фосфатный, бикарбонатный и др., где буферным компонентом служит анион кислотного остатка.

Выбор pH буфера для хроматографии полипептидов, олигонуклеотидов или белков должен послужить оптимизации условий разделения, как было пояснено выше. Этот выбор можно провести для одного белка, подлежащего очистке, или (в случае фракционирования) для всего исходного препарата. В первом случае для подбора pH нужно располагать хотя бы грубо очищенным белком. Эмпирически подбор оптимального значения pH можно производить по следующей схеме.

В 10 пробирок вносят шпателем примерно одинаковые (по 0,5 мл) порции влажного сорбента. Многократной декантацией уравнивают каждую порцию в 10 мл 0,5 М буфера (без соли или при минимальной ее концентрации), варьируя его pH через 0,5 единицы в нужном диапазоне (обычно pH 5—9 для анионообменников и pH 4—8 для катионообменников). Потом не менее чем пятикратной декантацией концентрированные буферы заменяют нормальными по концентрации (0,01—0,05 М) с теми же значениями pH, вносят одинаковые, заведомо не насыщающие обменник количества исходного препарата (или индивидуального белка) в каждую пробирку, перемешивают в течение 10 мин, дают осесть обменнику и в отстое определяют содержание исходного вещества по УФ-поглощению, специфической цветной реакции или радиоактивности.

Определяют значение pH, при котором вещество в отстое только что перестает обнаруживаться. Это значение соответствует начальному моменту практически полной сорбции всего препарата на колонку. Такой pH следует предпочесть и для рабочего элюента — он обеспечит узкую зону посадки исходного препарата. Полная сорб-

ция означает, что значения коэффициентов распределения между фазами велики для всех компонентов смеси; вместе с тем связь препарата с обменником будет еще лабильна, так что ею легко будет управлять путем введения соли.

Обычно белки оказываются достаточно заряженными и хорошо сорбируются при значениях pH, отличающихся от pI примерно на единицу. Если изoeлектрическая точка белка сильно сдвинута от нейтральной области и оптимальный pH выходит за границы рабочего диапазона слабого ионообменника, так что его приходится заменить сильным, то с самого начала при подборе pH имеет смысл во все буферы ввести соль в концентрации 0,1—0,2 M, с тем чтобы воспрепятствовать слишком прочной, многоточечной связи белка с обменником.

Есть вариант очистки вещества, когда оно свободно проходит через колонку, в то время как примеси на ней задерживаются. Подбор pH для этого варианта осуществляется аналогично, но выбор следует остановить на таком его значении, когда концентрация вещества в отстое только начинает уменьшаться, т. е. на моменте самого начала сорбции вещества на обменнике. Кстати, такой вариант очистки является наилучшим для лабильных белков — как потому, что он занимает минимальное время, так и потому, что любой процесс сорбции—десорбции таит в себе опасность денатурации белка. Иногда пропусканием белка без задержки последовательно через анионо- и катионообменник (при разных значениях pH буфера) удастся очистить белок почти полностью.

ВЫБОР КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛИ

Соль в составе элюента в момент посадки препарата на обменник может быть необходима для растворимости биополимера или сохранения его нативности, однако чаще всего ее вводят изначально для предотвращения слишком прочной сорбции исходного препарата. Обычно для обменников на основе целлюлозы исходная солевая концентрация должна быть около 0,01 M, для ионообменных сефадексов — на порядок выше.

Для целей хроматографической очистки белок желательно сорбировать на колонку в присутствии наибольшей концентрации соли, которая еще не мешает его практически полной сорбции, а элюировать — наименьшей концентрацией соли, обеспечивающей наиболее полную очистку от примесей, часть которых плохо сорбируется изначально, а часть не снимается с колонки в ходе элюции.

Подбор рабочих концентраций соли можно производить в пробирках, подобно тому как было описано для выбора pH. Обменник, уравновешенный выбранным буфером (для надежности — 0,1 M), равными порциями вносят в 10 пробирок и декантацией переводят в серию растворов соли (в том же буфере) возрастающей концентрации. Вносят во все пробирки одинаковые количества препарата и так же, как выше, оценивают степень его сорбции. В ряду возрас-

тающих концентраций соли находят последнюю пробирку, в отстое которой вещество еще не обнаруживается (полная сорбция). Далее замечают первую пробирку в этом ряду, где содержание вещества в отстое достигает максимума (пет сорбции). По концентрациям вещества в промежуточных пробирках можно построить кривую десорбции такого типа, как на рис. 113. Найденные таким образом граничные значения концентрации соли могут быть использованы при внесении препарата на колонку и в конце градиентной элюции.

СОХРАНЕНИЕ НАТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА

Чаще всего об этом приходится заботиться при очистке или фракционировании ферментов. Передко их хроматографию приходится вести на холоду, хотя для целей самого хроматографического процесса это и невыгодно — увеличивается вязкость элюента, ухудшается разрешение пиков (низкомолекулярные вещества хроматографируют при комнатной, а иногда и при повышенной, до 50—60°, температуре; в этом случае особое внимание должно быть уделено деаэрации обменника и элюента и опасности смены температур из-за возможности появления пузырей газа, как было подробно сказано в гл. 3).

Биологическая активность фермента в ходе хроматографии может измениться (как уменьшиться, так иногда в возрасти) в силу ряда дополнительных причин. Например, кажущееся увеличение активности фермента может быть результатом его отделения от протеаз. Снизиться активность может как в результате истинной денатурации или окисления SH-групп белка, так и при отделении апофермента от кофакторов. Иногда инактивация обусловлена разведением двух или нескольких последовательно работающих ферментов. Такого рода кажущиеся инактивации могут быть обнаружены при объединении хроматографических фракций, когда активность фермента восстанавливается. Для сохранения биологической активности липофильных белков мембран в элюент иногда приходится добавлять спирт или ацетон. При этом может возникнуть определенная неравномерность распределения органического растворителя между жидкостью внутри и снаружи гранул — ионы сорбента, гидратируясь, «оттягивают» на себя воду. Следствие этой неравномерности — наложение на ионный обмен эффекта распределительной хроматографии. Для сохранения биологической активности ферментов в элюент часто добавляют глицерин (до 25%) или этиленгликоль (до 5%).

ВЫБОР ОБЪЕМА ЭЛЮЕНТА

В случае изократической элюции полный объем элюента определяется коэффициентом распределения (K) наиболее прочно сорбированного компонента смеси: $V_R = V_0(1 + K)$. Иногда необходимый объем может оказаться очень большим — до 100 свободных

объемов колонки; соответственно возрастает и продолжительность хроматографии. Можно попытаться увеличить концентрацию соли в элюенте или изменить его рН так, чтобы уменьшить прочность сорбции всех компонентов фракционируемой смеси с обменником. Если при этом страдает разделение наиболее слабо связанных компонентов, то надо переходить к градиентной элюции.

Выбор граничных значений концентрации соли (или рН) градиента элюции был рассмотрен в предыдущем разделе. Объем градиента определяет его «крутизну». Слишком крутой градиент может быть причиной плохого разрешения соседних хроматографических зон (пиков) вещества, а чересчур пологий невыгоден из-за увеличения продолжительности хроматографии, поскольку скорость элюции лимитирована процессами диффузии вещества. Выбор объема градиента приходится вести эмпирически. Если пики веществ плохо разделяются, объем градиента увеличивают, если они излишне разнесены друг от друга — уменьшают. Если плохое разрешение пиков наблюдается только в начале линейного градиента, то следует перейти на вогнутую его форму, если только в конце — на выпуклую. Способы создания таких нелинейных градиентов описаны в гл. 3. Возможна ситуация, когда при элюции линейным градиентом компоненты смеси выходят в виде нескольких групп пиков, далеко отстоящих друг от друга, но плохо разрешенных внутри каждой группы. В этом случае следует построить составной градиент, в котором пологие линейные участки, отвечающие областям элюции каждой группы, будут чередоваться с крутыми участками градиента между группами. Обычно оптимальная крутизна градиента отвечает 5—20-кратному отношению его объема к объему колонки. Начинать подбор крутизны можно с отношения 10 : 1.

Заметим, что элюцию следует начинать сразу после внесения препарата на колонку или всегда с одной и той же задержкой, так как продолжительность первоначального контакта исходного препарата с обменником влияет на характер разделения его компонентов.

ВЫБОР РАЗМЕРОВ КОЛОНКИ

Начнем с вопроса о длине колонки. В гл. 1 было показано, что в случае изократической элюции разрешение пиков улучшается с увеличением длины колонки. Для градиентной элюции это не совсем так. Хроматографические зоны продвигаются по колонке намного медленнее, чем течет элюент. В случае градиентной элюции в какой-то момент времени ушедшую вперед зону может «догнать» концентрация соли, отвечающая практически полной десорбции мигрирующего в ней вещества. С этого момента такая зона будет двигаться вместе с элюентом. Когда это произойдет с последней, исходно наиболее прочно сорбированной зоной, все зоны, еще остающиеся в колонке, будут продвигаться с одинаковой скоростью, не расходясь, а даже сближаясь друг с другом за счет продольной диффузии веществ. Поэтому градиентную элюцию чаще всего ведут на срав-

нительно коротких колонках (20—40 см). Если приходится использовать пологий градиент, то ситуация приближается к варианту изократической элюции и длину колонки имеет смысл увеличивать. Подбор оптимальной длины ведут эмпирически. Колонки длиной более 100 см используются редко.

Длина колонок, заполненных мелкозернистыми обменниками типа «Аminex», и колонок высокого давления не превышает 40 см, а обычные их размеры лежат в пределах 15—25 см. Как уже указывалось, объем колонки определяется при изократической элюции объемом исходного препарата (соотношение объемов — от 1 : 100 до 1 : 20), а при градиентной — соотношением количества вещества и эффективной емкости колонки (загрузка па 5—10%). По выбранной длине и объему колонки подсчитывают ее диаметр. Однако в интересах обеспечения хорошей формы хроматографических зон отношение диаметра колонки к ее длине не должно превышать определенного предела. Для непрерывного градиента оно не должно быть больше 1 : 5, для изократической элюции — 1 : 20, в аналитических опытах — порядка 1 : 50, а в особо тонких случаях разделения это отношение снижают до 1 : 100 и даже 1 : 200. Здесь уместно напомнить обоснованное в гл. 1 правило: при перенесении условий хроматографического процесса, отработанных на маленькой колонке, на большую по объему (препаративную) колонку длина ее должна остаться без изменений (как и скорость элюции в расчете на 1 см² сечения). Площадь колонки увеличивают пропорционально повышению количества препарата, а расход элюента (мл/г) — пропорционально площади. Эту ситуацию можно себе представить как слияние нескольких аналитических колонок, работающих параллельно.

ВЫБОР СКОРОСТИ ЭЛЮЦИИ

Допустимую скорость элюции определяют процессы установления равновесного распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами. Подробно эти вопросы были рассмотрены в гл. 1. Было показано, что равновесие устанавливается тем быстрее, чем меньше размеры гранул и крупнее поры. Для больших молекул биополимеров с их замедленной диффузией время установления равновесия в хроматографических зонах увеличивается весьма существенно, так что скорость элюции должна быть соответственно уменьшена.

Скорость элюции, используемая в ионообменной хроматографии на колонках низкого давления, варьирует в широких пределах: от 50—100 мл/см²·ч при фракционировании аминокислот, нуклеотидов и других низкомолекулярных соединений до 2—5 мл/см²·ч для крупных белков. Ее приходится подбирать эмпирически. Признаком существенного превышения оптимальной скорости элюции служит асимметрия хроматографических пиков — растягивание их заднего фронта.

Если в ходе повторных опытов при одном и том же перепаде давления скорость течения элюента через колонку уменьшается, то

причина, скорее всего, может заключаться в засорении верхней части колонки нерастворенными частицами. В этом случае слой обменника из верхней части колонки высотой 2—3 см можно удалить и заменить свежим, как было описано в гл. 4 для гель-фильтрации.

Ионообменная ЖХВД позволяет вести хроматографию низкомолекулярных веществ с большой скоростью — до 800 мл/см²·ч. Уже не раз подчеркивалось, что скорости такого порядка нельзя применять при хроматографии белков. Линейные размеры гранул для ЖХВД уменьшены по сравнению с обычными ионообменниками в 5—10 раз, а скорость поперечной диффузии тяжелых макромолекул, естественно, остается той же самой. Соответственно и скорость элюции при хроматографии белков можно увеличить лишь пропорционально линейным расстояниям диффузии, т. е. до 10—50 мл/см²·ч.

СБОР И ОБРАБОТКА ФРАКЦИЙ

Денситометры, флюориметры и коллекторы фракций были описаны в гл. 3. Так как в случае ионообменной хроматографии объем препарата, особенно при градиентной элюции, может быть значительным, принято сбор и нумерацию фракций начинать с момента внесения препарата на колонку.

Фракции после ионообменной хроматографии часто содержат много соли, поэтому их неудобно концентрировать простым высушиванием, но можно воспользоваться ультрадиализом под давлением. С этой точки зрения удобно пользоваться для элюции летучими буферами и солями, которые можно упарить в роторном испарителе. Если они «летят» медленнее, чем вода, то в ходе упаривания во фракции несколько раз добавляют воду.

РЕГЕНЕРАЦИЯ ИОНООБМЕННИКА

Очистку обменника от остатков сорбированных веществ осуществляют промывкой его крепким (2 М) соевым раствором, а если необходимо, то еще и щелочью допустимой для данного обменника концентрации. Затем следует обильная промывка водой и уравнивание исходным буфером.

Из-за сжатия обменника в крепком соевом растворе (сефадексы, волокнистая целлюлоза и др.) далеко не всегда его регенерацию можно вести непосредственно в колонке, так как в ходе последующей промывки водой гранулы обменника будут деформироваться. В этих случаях обменник приходится извлекать из колонки и регенерировать в свободном объеме декантацией или промывкой на фильтре.

АМИНОКИСЛОТНЫЕ АНАЛИЗАТОРЫ

Фракционирование аминокислот — важная область применения ионообменной хроматографии, обеспечивающая в первую очередь анализ аминокислотного состава белков и пептидов после их исчерпывающего гидролиза, а также физиологических жидкостей и пище-

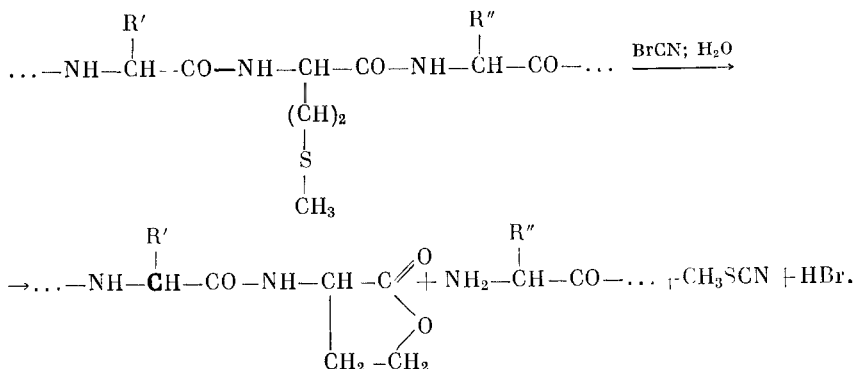
вых продуктов. Ввиду особой важности и распространенности таких анализов были отработаны оптимальные режимы их осуществления и созданы специальные автоматические приборы — аминокислотные анализаторы. В большинстве современных научно-исследовательских учреждений проведение анализа аминокислотного состава полипептидов с помощью аминокислотных анализаторов поручается специализированным группам обслуживания и исследователям-биохимикам не приходится самим использовать эту технику. По этой причине описание аминокислотных анализаторов и методов осуществления анализа вынесено в прил. 2, помещенное в конце книги.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ

Для установления последовательности аминокислот в белке (анализа первичной структуры) или для целей идентификации белковую молекулу целесообразно разбить на определенные фрагменты — олигопептиды, или пептиды (эти термины приблизительно равнозначны; в дальнейшем мы будем пользоваться только вторым из них). Расщепление должно быть проведено по небольшому числу вполне определенных мест в полипептидной цепочке белка, для того чтобы путем фракционирования можно было получить гомогенные популяции различных фрагментов. Его можно осуществить путем химического или ферментативного гидролиза. Познакомимся вкратце с наиболее распространенными способами решения этой задачи.

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ГИДРОЛИЗА БЕЛКОВ

Наибольшей популярностью пользуется обработка белка бромистым цианом (BrCN). При этом пептидная связь разрывается только рядом с остатком метионина — с его карбоксильного конца. Сера вместе с метильной группой уходит в составе летучего метилтиоцианата, а на С-конце пептида остается лактон гомосерина:



Белок растворяют в 70%-ной HCOOH , добавляют 100-кратный против ожидаемого молярного содержания Met избыток BrCN и в

запаянной ампуле под азотом перемешивают в темноте при комнатной температуре в течение 16—20 ч. После окончания реакции смесь разбавляют водой (10 : 1) и лиофилизируют, освобождаясь таким образом от метилтиоцианата, бромистоводородной и муравьиной кислот.

Из побочных реакций опасность представляет только неконтролируемое окисление цистеина. Чтобы предотвратить его, перед гидролизом проводят карбоксилирование остатков цистеина по сере иодуксусной кислотой или иодацетамидом. Для этого 100 мкг белка растворяют в 0,2 мл 0,5 М Трис-HCl (pH 8,5), содержащего 6 М гуанидинхлорида, 8 мМ β-меркаптоэтанол и 0,25 М ЭДТА, и перемешивают в течение часа микромагнитом под струей сухого азота. За это время происходит денатурация белка, восстановление цистина до цистеинов и удаление кислорода. Затем добавляют 10 мкл свежеприготовленного 0,3%-ного водного раствора иодуксусной кислоты. Карбоксиметилирование идет в течение 20 мин в темноте. Избыток иодуксусной кислоты нейтрализуют добавлением 10 мкл β-меркаптоэтанол, после чего препарат диализуют против NH_4 -бикарбонатного буфера и лиофилизируют.

Обычно белки содержат мало остатков Met, поэтому в результате описанного метода гидролиза получают крупные пептиды.

Химический гидролиз по остаткам *тирозина* можно осуществить действием на белок N-бромсукцинимид. Например, 3 мг белка растворяют в 3,3 мл 50%-ной CH_3COOH и добавляют при комнатной температуре порциями по 10 мкл раствор N-бромсукцинимид в такой же кислоте (22 мг/мл) до прекращения увеличения оптической плотности раствора при 260 нм (A_{260}). Затем его можно разбавить водой и лиофилизировать [Van Helden et al., 1979].

Гидролиз белка по остаткам *триптофана* происходит под действием о-иодбензойной кислоты [Mahoney, Hermodson, 1979] или реактива, выпускаемого фирмой «Pierce» под торговым названием «BNPS-skatole» [Heiland, Wittman-Liebold, 1979].

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ГИДРОЛИЗА БЕЛКОВ

Наиболее распространенным и определенным по своим результатам является гидролиз трипсином, приводящий к разрыву полипептидной цепи по карбоксильным группам аргинина и лизина. При желании разрыв по Lys можно блокировать модификацией этой аминокислоты по ее ε-аминогруппе действием ангидрида янтарной кислоты.

После обработки иодацетамидом и лиофилизации 0,1—0,2 мкмоль белка растворяют в 3 мл 5 М раствора гуанидинхлорида (для денатурации), титруют 0,5 н. NaOH до pH 9,5, добавляют 100-кратный против ожидаемого содержания Lys избыток ангидрида янтарной кислоты и перемешивают в течение 1 ч, подтитровывая до pH 9—9,5 щелочью. Затем диализуют против 0,1 М NH_4HCO_3 и лиофилизируют [Robinson, Appella, 1979]. Белок малого размера вместо гуанидинхлорида можно денатурировать в 6 М растворе мочевины.

Модификацию Lys можно вести и с помощью ангидрида малеиновой кислоты [Van Heiden et al., 1979]. В случае последующего автоматического секвенирования для модификации лучше использовать ангидрид более гидрофобной цитраконовой кислоты [Williams et al., 1980]. Блокирование разрыва по Arg можно осуществить обработкой белка 1,2-циклогександионом (используется редко).

В продажных препаратах обычного трипсина всегда есть небольшая примесь химотрипсина, который разрывает полипептидную цепочку по остаткам Phe, Tyr и Leu, что повышает «фон» при фракционировании трипсиновых пептидов. Во избежание этого предпочтительно использовать трипсин, обработанный ингибитором химотрипсина N-тозил-L-фенилаланилхлорметилкетон (TPCK). Торговое наименование обработанного таким образом трипсина — «TPCK-trypsin».

Гидролиз трипсином проводят в слегка щелочной среде (NH_4 -бикарбонатный буфер, pH 8) в течение 2—3 ч при 37°. Весовое соотношение фермент/белок должно составлять примерно 1 : 50. Иногда трипсин добавляют двумя порциями с интервалом в 1—1,5 ч, с тем чтобы уменьшить эффект автолиза фермента. По этой же причине растворять трипсин следует непосредственно перед его использованием. Ввиду относительно малого количества фермента его, как правило, не удаляют из реакционной смеси, а всю ее лиофилизируют.

Условия ферментативного гидролиза мягче, чем при химическом гидролизе, однако окисление цистеина возможно, поэтому его нередко и в этом случае предпочитают предварительно модифицировать или окислить (вместе с Met).

Lys и Arg в совокупности обычно представлены в белке значительно бóльшим числом остатков, чем Met, поэтому трипсиновые пептиды мельче. Нередко трипсином гидролизуют BrC.N-пептиды после их разделения.

Реже используются другие варианты ферментативного гидролиза: химотрипсином, протеазой из *Staphylococcus aureus* (по Asp и Glu), термолизином (по Val, Leu, Ile и Phe). Главные их недостатки — множественность и неравноценность точек разрыва. При гидролизе исходного белка это дает высокий фон, однако для дополнительного гидролиза уже очищенных пептидов указанные методы вполне пригодны.

Сводную таблицу и описание ориентировочных условий для десяти вариантов химического и ферментативного гидролиза белков можно найти в работе [Heiland, Wittmann-Liebold, 1979].

Изысканная комбинация химической модификации с ионообменной хроматографией была использована для быстрого отбора из совокупности пептидов, полученных после трипсинового гидролиза, тех из них, которые содержат Met. Смесь трипсиновых пептидов растворяли в 30%-ной CH_3COOH и обрабатывали радиоактивно меченным иодацетамидом. На атоме серы метионина возникал дополнительный положительный заряд, поэтому при хроматографии на сильном катионообменнике такие пептиды задерживались по сравнению с нормальным положением их элюции. По наличию метки со-

ответствующие фракции отбирали, освобождали Met от модификации растворением в 0,12 М β -меркаптоэтанолу и хроматографировали снова в тех же условиях. Теперь пептиды, содержавшие Met, элюировались раньше, чем сопровождавшие их при первом фракционировании посторонние пептиды [Degen, Kyte, 1978].

ХРОМАТОГРАФИЯ ПЕПТИДОВ

Для фракционирования пептидов используют различные методы колоночной хроматографии и ТСХ. Ранее мы уже знакомились с разделением пептидов гель-фильтрацией и обратнофазовой гидрофобной хроматографией. Передко, если пептидов много, хроматографические методы следуют один за другим. Например, сначала пептиды разделяют на группы по размерам гель-фильтрацией, а затем следует ХОФ или ионообменная хроматография.

Чаще всего пептиды фракционируют на крупнопористых катионообменниках. Описано, например, разделение BrCN-пептидов на колонке катионообменной целлюлозы CM-52 фирмы «Whatman» ($1,2 \times 35$ см). Элюцию вели линейным градиентом (400 мл) 0,01—0,03 М фосфатного буфера с одновременным изменением pH от 6 до 8. Для предотвращения агрегации пептидов и неспецифической сорбции на целлюлозе в буферы вводили 8 М мочевины. Авторы отмечают, что элюция изменением только ионной силы (при постоянном pH) дает более широкие пики и худшее разрешение [Huang et al., 1976].

Для менее крупных пептидов можно использовать более сильные катионообменники. В качестве примеров можно привести фракционирование трипсиновых пептидов рибонуклеазы на фосфоцеллюлозе P-11 фирмы «Whatman» с помощью градиента концентрации KCl в разбавленной ортофосфорной кислоте [Chin, Wold, 1977]. Сампайо и соавторы вели разделение гормона брадикинина (пептидная цепочка из девяти аминокислотных остатков) и родственных ему пептидных гормонов Lys- и Met-Lys-брадикинина на сильном катионообменнике «SP-Sephadex» C-25 изократической элюцией 0,12 М NaCl в 0,02 М Трис-HCl (pH 8,4) [Sampaio et al., 1977].

Иногда пептиды, обогащенные остатками кислых аминокислот, предпочитают фракционировать на анионообменных целлюлозах и сефадексах. Сравнительно короткие трипсиновые пептиды можно фракционировать и на полистирольных смолах (разумеется, следует отдать предпочтение высококачественным смолам типа «Aminex»). Для элюции с катионообменников удобно использовать летучие пиридинацетатные буферы, например линейный градиент следующего вида: 0,2 М пиридинацетат (pH 3,4) — 2 М пиридинацетат (pH 5). Для сложных смесей пептидов можно рекомендовать две ступени линейных градиентов: 0,05 М пиридинацетат (pH 2,6) — 0,5 М пиридинацетат (pH 3,8), а далее — опять до 2 М пиридинацетата (pH 5). Для анионообменников типа «Aminex» хорошие результаты можно получить с помощью градиента такого вида: 0,36 М пиридин (pH 9,4) — 2 М пиридинацетат (pH 5). Здесь всюду молярность ука-

зана по пиридину, который титруют 6 М CH_3COOH (0,36 М раствор пиридина с рН 9,4 — это просто 3%-ный водный раствор пиридина). Для работы на наномолярном уровне пиридин должен быть хорошо очищен кипячением с обратным холодильником над нингидрином и перегонкой.

Описана автоматическая система анализа пептидов на колонке со смолой «Beckman AA-15» [Herman, Vanaman, 1977]. В аналогичных условиях проводили фракционирование пептидов трипсинового гидролизата на смоле «Aminex A-5» [Ikeda, Steiner, 1979].

Окрашивать пептиды после колонки можно нингидрином, но при этом необходимо освободить концевые аминокислоты пептидов от возможных модификаций и разрушить пролин, если он окажется на конце пептида. В 3—5 раз более высокую чувствительность регистрации пептидов обеспечивает окраска тринитробензолсульфокислотой [Spadaro et al., 1979]. Полагаться при регистрации на УФ-поглощение при 280 нм рискованно, так как в некоторых пептидах может не оказаться остатков ароматических аминокислот. Регистрация при 206—220 нм — наиболее надежный метод. Можно воспользоваться и одним из флуоресцентных красителей — ОФА или флуоресцамином [Lau, 1977].

Ионообменную хроматографию пептидов методом ЖХВД можно осуществить очень эффективно, особенно если воспользоваться крупнопористым обменником. Недавно группа японских авторов описала фракционирование 1 мг трипсинового гидролизата кальмодулина из мозга быка на «макроретикулярной» полистирольной анионообменной смоле «Diaion CDR-10» (Япония) с диаметром зерен 5—7 мкм. Стальная колонка размером $0,4 \times 50$ см работала под давлением около 100 атм. Температура в ходе элюции изменялась от 22 до 70°. Элюцию вели выпуклым градиентом концентрации ацетонитрила, метансульфокислоты и изопропанола в воде, регистрацию пиков — по УФ-поглощению при 210 нм. На рис. 117, заимствованном из этой работы, можно видеть хорошее разделение 10 пиков, из которых только один (второй от начала элюции) содержал смесь двух пептидов. Все фракционирование занимало лишь 70 мин [Takahashi et al., 1981].

Такое же качество фракционирования пептидов трипсинового гидролизата фермента лакказы А из плесени на новом анионообменнике «2133 UltroPac TSK 545 DEAE» приводит в своих рекламных материалах фирма «LKB». Элюцию с колонки размером $0,75 \times 15$ см вели линейным градиентом концентрации NaCl (0—1 М) в 0,02 М Tris-HCl , рН 8, со скоростью 105 мл/см²·ч. Разделение занимало менее 3 ч («LKB Application and Technical Notes», 2133-000-AP4).

Разделение пептидов на колонке «MicroPak AX-10» осуществляли с помощью линейного градиента концентрации соли: 25—100% 0,01 М триэтиламмонийацетатного буфера (рН 6) в смеси с ацетонитрилом. Очень кислые пептиды элюировали дополнительно 0,04 М HCOOH при 60°. Использование летучих элюентов облегчало дальнейший анализ состава пептидов [«Dizdaroglu et al., 1982»].

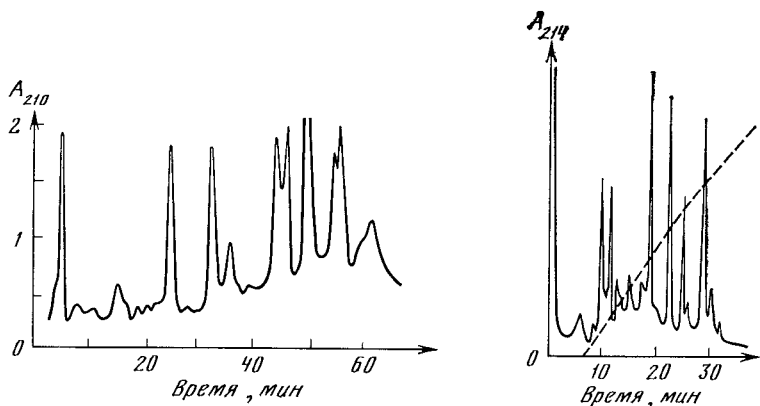


Рис. 117. Фракционирование трипсиновых пептидов кальмодулина из мозга быка на колонке полистирольной анионообменной смолы «Diaion CDR-10» [Takahashi et al., 1981]

Рис. 118. Фракционирование пептидов трипсинового гидролизата целлюлазы из *Trichoderma reesei* на анионообменнике «Mono Q» при умеренном давлении (по материалам фирмы «Pharmacia»)

Ранее в этой главе мы описали выдающиеся достижения фирмы «Pharmacia» в разработке ионообменников нового типа, с появлением которых, по-видимому, начинается новый этап развития ионообменной хроматографии белков и пептидов при умеренных давлениях. Рис. 118, заимствованный из рекламного материала фирмы, иллюстрирует разрешающую способность новой системы на примере фракционирования пептидов трипсинового гидролизата целлюлазы из *Trichoderma reesei* с использованием анионообменника «Mono Q». Элюцию вели линейным градиентом концентрации NaCl (0,0025—0,5 М) в 0,02 М Трис-HCl, pH 8, со скоростью 1 мл/мин на стеклянной колонке размером 0,5 × 5 см под умеренным давлением. Все разделение занимало около 30 мин («The Pharmacia FPLC System» — проспект фирмы «Pharmacia»).

ОЧИСТКА И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Очистка и разделение белков (наряду с аминокислотным анализом) — основные области применения ионообменной хроматографии. Верно и обратное — в очистке любого белка этот вид хроматографии почти всегда занимает центральное положение. Поэтому при изложении общих соображений о выборе параметров хроматографического процесса в предыдущих разделах этой главы мы имели в виду прежде всего хроматографию белков. Был приведен соответствующий справочный и методический материал, отмечены аспекты, связанные с сохранением биологической активности и возможностью появления артефактов кажущейся утраты ферментативной активности и

т. д. Нет смысла повторять эти соображения снова; теперь можно перейти к иллюстрации высказанных ранее общих положений на ряде примеров, отобранных из множества публикаций последних двух-трех лет, разбив их по характеру поставленной задачи на три неравные по своему объему группы. При отборе мы старались избежать повторений, с тем чтобы каждый пример отличался каким-либо своеобразием методического подхода к решению задачи, которое мы будем отмечать.

КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ БЕЛКА

Пример 1. Очистка *SI*-нуклеазы из *Aspergillus* [Vogt, 1980]. После одного из этапов хроматографической очистки фермента на колонке DEAE-целлюлозы ($1,8 \times 17$ см), когда его сорбировали в буфере с pH 7,5, т. е. достаточно прочно, а элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0,05—0,35 M) в том же буфере, встала задача концентрирования отобранных по биологической активности фракций. Эти фракции объединяли, путем диализа переводили в 0,03 M Na-ацетатный буфер (pH 4,6), содержавший 0,02 M NaCl, и в таком растворе сорбировали на маленькую колонку (объемом 1,5 мл) DEAE-целлюлозы. Очевидно, что в кислом буфере фермент садился непрочно и тот же буфер с добавлением NaCl до 0,5 M снимал его полностью в малом объеме.

В этом примере интересно отметить различие в pH при посадке белка на один и тот же обменник, но с разными целями — для очистки и для концентрирования.

Пример 2. Концентрирование методом вытеснительной хроматографии [Torres, Peterson, 1979]. На колонку DEAE-целлюлозы объемом всего лишь в 0,15 мл (пипетка на 1 мл) сорбировали 10 мг β -лактоглобулина из 50 мл (!) 0,01 M Na-фосфатного буфера, pH 7,5. Затем на колонку подавали 1%-ный раствор карбоксиметилированного декстрана в том же буфере. Белок выходил в объеме 1 мл, а декстран оставался в колонке. Описано карбоксиметилирование декстрана; на каждый остаток глюкозы присоединялось по одному карбоксиметильному радикалу. Преимущество этого метода в том, что в элюате белка не было соли. Аналогичный прием был использован для концентрирования РНК-полимеразы II из печени петуха [Kastern et al., 1979].

ПРЕПАРАТИВНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА РАННИХ СТАДИЯХ ОЧИСТКИ БЕЛКА

Эта область ионообменной хроматографии белков наиболее обширна. Сделаем попытку систематизации используемых здесь приемов, разделив их на шесть групп. Но прежде всего заметим, что постановке хроматографического опыта в любом случае должна предшествовать отработка метода идентификации очищаемого белка (путем обнаружения ферментативной активности или других биоло-

гических функций, специфического окрашивания, образования определенного комплекса или хотя бы по положению полосы при электрофорезе). Не будем рассматривать эти методы; в каждом конкретном случае они должны быть отработаны специально, причем идентификация должна быть надежной с самого начала, со стадии неочищенного препарата.

Пачнем рассмотрение с простейшего и наиболее распространенного варианта очистки с использованием ионообменника одного типа для случая, когда очищаемый белок по своим хроматографическим свойствам ничем особенным не выделяется из прочих белков исходной смеси.

Пример 3. Первый этап очистки орнитиндекарбоксилазы из печени теленка [Haddox, Russel, 1981]. Фермент лабилен — инактивируется при разбавлении. Условия хроматографии подбирали так, чтобы его концентрация все время оставалась высокой. 1,8 л гомогената печени после центрифугирования (40 000 g, 30 мин) перемешивали в объеме с 600 мл густой суспензии «DEAE-Sephacel» (1 : 1) в растворе следующего состава: 0,05 M NaCl + 2 mM ДТТ + + 0,1 mM ЭДТА + 0,1 mM ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид — ингибитор протеаз), промывали на фильтре 4 л того же раствора и загружали в колонку, где уже находилось 100 мл того же самого, но свободного от вещества ионообменника. Элюцию вели линейным градиентом (3 л) 0,05—0,6 M NaCl. На рис. 119 представлен результат очистки. Несмотря на лабильность фермента, авторам удалось на этом этапе получить 100%-ный выход его по активности при очистке в 45 раз. Сходным образом очищали на первом этапе фосфатазу из 1,5 кг скелетных мышц кролика с той разницей, что хроматографию вели на DEAE-сефадексе А-50 [Vandenheede et al., 1981].

В последующих примерах очистки мы не будем приводить профили элюции, так как все они выглядят примерно одинаково: пик той или иной «активности» очищаемого белка на фоне широкого профиля распределенных по всему объему элюции балластных белков. Сосредоточим свое внимание на выборе условий хроматографии.

Пример 4. Очистка РНКазы D из E. coli [Cudny et al., 1981]. Здесь хроматографию на слабых анионообменниках использовали на двух первых этапах очистки. Интересно сопоставить их между собой. Освобожденный центрифугированием от рибосом гомогенат 300 г бактерии вносили на колонку DEAE-целлюлозы (8 × 25 см), уравновешенную 0,06 M раствором KCl в 0,02 M Трис-HCl (pH 7,5) с обычными для хроматографии белков защитными добавками (5 mM

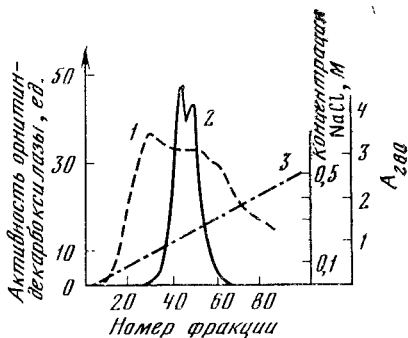


Рис. 119. Очистка орнитиндекарбоксилазы из печени теленка на колонке с «DEAE-Sephacel» [Haddox, Russel, 1981]

- 1 — A_{280} ;
- 2 — активность фермента;
- 3 — концентрация NaCl

$\text{MgCl}_2 + 0,1 \text{ мМ ДТТ} + 0,1 \text{ мМ ЭДТА} + 0,1 \text{ мМ ФМФС}$). Колонку промывали сначала 0,05 М, затем 0,1 М растворами KCl в том же буфере и элюировали ступенчатым увеличением концентрации KCl до 0,2 М. Отобранные по активности фракции разбавляли до концентрации 0,11 М по KCl , вносили на колонку DEAE-сефадекса А-50 ($5 \times 25 \text{ см}$), промывали тем же раствором и элюировали линейным градиентом (7 л) 0,11—0,3 М KCl . Здесь интересно отметить увеличение концентрации соли при посадке и элюции для анионообменного сефадекса по сравнению с целлюлозой. В связи с этим вспомним, что сефадексы имеют большую емкость (следовательно, и более высокую плотность распределения зарядов), чем целлюлозы.

Последние годы отмечены повышенным интересом к ферментам, взаимодействующим с ДНК. Большинство из них — белки основного характера, и их удобнее очищать на катионообменниках; чаще всего для этой цели используют фосфоцеллюлозу.

Пример 5. Очистка ДНК-полимеразы I из *E. coli* [Rhodes et al., 1979]. На первых этапах здесь использовали грубую очистку осаждением полиэтиленимином и сульфатом аммония. Затем следовал этап хроматографической очистки на колонке фосфоцеллюлозы, уравновешенной 0,04 М К-фосфатным буфером (рН 6,9) с обычными добавками, включая 5% глицерина. Введение глицерина продиктовано лабильностью фермента — его активность снижается вдвое за сутки. Препарат вносили в том же буфере, им же промывали колонку, а затем вели элюцию линейным градиентом концентрации этого буфера (0,04—0,3 М). Таким образом, вытесняющий белок контрион (K^+) поставлялся самим буфером.

Пример 6. Очистка рестриктазы EcoR1 [Rubin, Modrich, 1980]. Нарботку вели в весьма внушительных масштабах — фермент выделяли из 4,73 кг бактериальной массы. Как и в предыдущем случае, очистку начинали с осаждения ДНК стрептомицинсульфатом и грубого фракционирования белка осаждением сульфатом аммония. Затем следовала хроматография на фосфоцеллюлозе Р-11 фирмы «Whatman». Колонку размером $10 \times 45 \text{ см}$ (объем 3,5 л) уравнивали 0,1 М раствором KCl в 0,02 М К-фосфатном буфере (рН 7,4) с добавками (0,5 мМ ЭДТА + 5 мМ β -меркаптоэтанол + 10% глицерина). Грубо очищенный фермент диализом переводили в такой же раствор, вносили на колонку, промывали ее 7 л 0,2 М KCl и элюировали линейным градиентом (36 л) 0,2—1 М KCl в том же буфере, собирая фракции по 0,6 л. Затем следовали этапы адсорбционной хроматографии на оксиапатите и аффинной хроматографии на ДНК-целлюлозе.

Пример 7. Первый этап очистки интерферона из клеток асцита Эрлиха [Cabrer et al., 1979]. Этот пример заслуживает упоминания необычностью использованного сорбента — пористого стекла. Ранее упоминалось, что на поверхности стекла имеется небольшой отрицательный заряд, из-за которого оно не нашло себе применения в гель-фильтрации. В данном случае это обстоятельство было использовано. В слабощелочном фосфатном буфере колонка, заполненная пористым стеклом марки СРG-10-240 Å (120/200 МЕШ), за-

держивала интерферон. Элюцию осуществляли нейтрализацией заряда на стекле путем смены буфера (0,4 М глицин-HCl, pH 3,5).

Ко второму варианту отнесем те случаи, когда очищаемый белок сильно отличается по своему заряду (т. е. по кислотности или основности) от всех остальных белков исходной смеси. В этом случае нередко удается так подобрать условия хроматографии, чтобы только нужный белок сорбировался на обменнике, а все примеси сравнительно легко вымывались исходным буфером. По существу это — процесс экстракции. Сорбированный белок затем «выбивают» из колонки в минимальном объеме, как при концентрировании. Может быть и обратная ситуация: очищаемый белок свободно проходит через колонку, на которой задерживаются примесные белки. Иногда такие резкие различия в хроматографическом поведении приводят еще и к освобождению нужных белков из их природных комплексов.

Пример 8. Удаление гистонов H1 и H5 из хроматина эритроцитов курицы [Libertini, Small, 1980]. Предварительно очищенный хроматин в 0,01 М растворе Трис-HCl (pH 7,8) с 1 mM CaCl₂ частично переваривали микрококковой нуклеазой, а затем в раствор добавляли сухой СМ-сефадекс (30 мг на 1 мл), очень медленно приливали 5 М NaCl до конечной концентрации 0,05 М и перемешивали в течение часа при 0°. Гистоны H1 и H5 диссоциируют от ДНК и переходят на обменник (заодно туда же сорбируется и нуклеаза). Суспензию переносили в колонку и вымывали хроматин, сохранивший связь ДНК с остальными гистонами (что в данном случае и представляло интерес). Гистоны H1 и H5 можно снять с колонки элюцией 2 М NaCl.

Пример 9. Отделение σ -фактора от остальных белков РНК-полимеразы *E. coli* [Zimmer, Millette, 1979]. На колонку фосфоцеллюлозы «Whatman P11», уравновешенную 0,05 М раствором NaCl в 0,01 М Трис-HCl, pH 8,1 (с обычными добавками), вносили предварительно очищенную РНК-полимеразу. Все белки комплексного фермента, кроме σ -фактора, сорбировались, а последний диссоциировал и выходил в ходе промывки колонки тем же раствором. Остальные белковые субъединицы фермента можно было снять одну за другой элюцией линейным градиентом концентрации KCl (0,05—0,5 М).

Следующий вариант относится к случаям, когда в области pH, обеспечивающей сохранение нативности белка, он несет достаточно выраженный электрический заряд, т. е. обладает явным сродством к ионообменнику одного типа. Тогда для полной очистки белка можно использовать последовательно два разных ионообменника: на одном из них белок сорбировать, затем снять его ступенчатой элюцией и пропустить через обменник противоположного типа. Нужный белок пройдет свободно, оставив на колонке примеси, не отделившиеся на первом ионообменнике.

Пример 10. Считка РНК-полимеразы II из гриба *Agaricus bisporus* [Vaisius, Horgen, 1979]. Предварительно грубо очищенную осаждениями полиэтиленгликолем и сульфатом аммония РНК-полимеразу сначала сорбировали на колонку DEAE-целлюлозы (объ-

емом 250 мл) в буфере с pH 7,9, содержащем 0,15 М сульфата аммония (СА). После промывки этим же раствором фермент снимали в 225 мл того же буфера, но содержащего 0,25 М СА. Сопоставление концентраций соли при посадке и элюции с учетом объема последней говорит о том, что фермент был сорбирован слабо, почти по всему объему колонки. Для элюции одной ступенью повышенной концентрации соли в этом нет ничего плохого, зато можно ожидать, что многие примеси не сорбировались в присутствии 0,15 М СА или не снимались при столь умеренном увеличении этой концентрации. Вышедший из первой колонки белок осаждали увеличением концентрации того же СА, затем переводили в буфер, содержащий 0,075 М СА, и вносили в колонку СМ-целлюлозы. На этой колонке фермент не задерживался, а примеси оставались.

Заметим, что в некоторых примерах использовалась элюция ступенчатым повышением концентрации соли. Статический или динамический характер носит при этом хроматографический процесс, зависит от прочности исходной сорбции белка и протяженности зоны его связывания по отношению к длине колонки. С этих позиций только что цитированный пример следует отнести к статическому типу хроматографии.

В следующем варианте различие сродства белка к ионообменникам обоих типов выражено не сильно, поэтому на двух последовательных этапах очистки можно использовать динамическую хроматографию на обменниках противоположных типов. Часто это удается сделать, сохраняя значение pH вблизи нейтрального, когда на поверхности белка имеются заряды как одного, так и другого знака.

Пример 11. Очистка фактора инициации белкового синтеза eIF-2 из ретикулоцитов кролика [Stringer et al., 1980]. Исходным материалом служил супернатант после промывки рибосом 0,5 М KCl. После грубого фракционирования переосаждением СА и первоначальной хроматографической очистки пропусканием смеси белков через маленькую колонку DEAE-целлюлозы в условиях, когда eIF-2 не сорбируется (0,25 М KCl, pH 7,5), следовали два этапа динамической хроматографии. На первом этапе материал снова вносили на колонку DEAE-целлюлозы при pH 7,5, но на этот раз — в 0,05 М KCl (при такой концентрации соли фактор сорбируется на обменник). Его элюировали линейным градиентом 0,05—0,3 М KCl; eIF-2 выходил во фракциях между 0,15 и 0,2 М. Объединенные фракции разбавляли до концентрации соли 0,1 М, и на втором этапе динамической хроматографии использовали колонку СМ-целлюлозы, уравновешенную раствором соли такой же концентрации (pH 7,3). Элюцию вели линейным градиентом 0,15—0,8 М KCl; теперь eIF-2 элюировался между 0,3 и 0,35 М KCl.

Сопоставляя условия хроматографии на этих двух этапах, можно заключить, что фактор инициации обладает большим сродством к катионообменнику, чем к анионообменнику, но при pH 7,3—7,5 амфотерные свойства этого белка, по-видимому, выражены достаточно хорошо, чтобы обеспечить возможность хроматографии на

обменниках обоих типов. В заключение следовал еще один этап статической хроматографии: фракции, обладающие активностью, подкисляли до pH 6,5, разбавляли до концентрации KCl 0,15 М и вносили на маленькую колонку (0,5 мл) «Bio-Rex 70», уравновешенную тем же раствором. Благодаря подкислению белок «садился» несколько более прочно, так что колонку можно было промывать 0,3 М KCl, после чего фактор инициации «снимали» в малом объеме 0,6 М KCl.

Очень похожий вариант очистки того же белка был независимо отработан в другой работе, где на первом этапе динамической хроматографии на DEAE-целлюлозе осуществляли элюцию ступенчатым градиентом 0,05—0,1—0,22 М KCl при pH 7,4, а на втором — использовали колонку фосфоцеллюлозы, откуда eIF-2 элюировали линейным градиентом 0,4—0,7 М KCl при pH 7,8. Некоторый сдвиг диапазона концентраций соли к большим значениям и увеличение pH связаны, очевидно, с тем обстоятельством, что фосфоцеллюлоза является более сильным катионообменником, чем карбоксиметилцеллюлоза [Kaempfer et al., 1979].

К следующему, пятому по счету варианту хроматографической очистки можно отнести те случаи, когда во взаимодействии белка с ионообменником существенную роль могут играть ионы Mg^{2+} или других двухвалентных металлов.

Пример 12. Очистка РНК-полимеразы II из плесени *Aspergillus nidulans* [Stunnenberg et al., 1981]. Мы преднамеренно выбрали работу, в которой объект очистки очень сходен с тем, что фигурировал в примере 10, для того чтобы подчеркнуть важность учета индивидуальных особенностей материала при решении каждой конкретной хроматографической задачи.

В данной работе для очистки сначала использовали два последовательных этапа хроматографии на анионообменниках — DEAE-сефадексе А-25 и DEAE-сефарозе CL-6В. В обоих случаях препарат вносили на колонку в 0,05 М Трис-HCl (pH 7,9), содержащем, помимо обычных стабилизирующих добавок, 0,15 М СА. С DEAE-сефадекса элюцию вели линейным градиентом концентрации СА (0,15—0,4 М), а с DEAE-сефарозы — изократически, 0,4 М раствором СА в том же буфере (надо полагать, что на сефадексе типа А-25 белок сорбировался в основном на поверхности гранул). После дополнительной очистки центрифугированием в градиенте плотности раствора сахарозы препарат вносили на колонку фосфоцеллюлозы «Whatman P11» в том же самом буфере, но с меньшей концентрацией СА (0,02 М) и элюировали линейным градиентом его концентрации (0,02—0,3 М).

На первый взгляд условия элюции с обменников обоих типов очень похожи, хотя сродство белка к анионообменникам, по-видимому, несколько больше, чем к фосфоцеллюлозе. Однако более внимательное рассмотрение условий хроматографии обнаруживает еще одно (в данном случае — важное) отличие. В состав обычных стабилизирующих добавок для обоих анионообменников входили, помимо глицерина, 5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ β -меркаптоэтанола, 1 мМ

ЭДТА и 1 мМ ФМСФ. В буфере для хроматографии на фосфоцеллюлозе также присутствовали все эти добавки, за исключением $MgCl_2$. По-видимому, ионы Mg^{2+} исключены из-за их способности образовывать «мостики» между отрицательно заряженными группами белка и катионообменника. Здесь такие дополнительные связи были бы излишними, но в других случаях хроматографии на катионообменниках они могут участвовать во фракционировании белков.

Наконец, можно привести примеры таких вариантов очистки, когда амфотерная природа белков обуславливает одинаковую степень их сродства к обменникам обоих типов, что позволяет вести фракционирование на анионо- и катионообменниках в практически идентичных условиях.

Пример 13. Очистка РНК-полимеразы I из цветной капусты [Guifoyle, 1980]. Автор последовательно использовал три этапа хроматографической очистки: на фосфоцеллюлозе с элюцией линейным градиентом концентрации СА (0,075—0,5 М), на DEAE-сефадексе и DEAE-целлюлозе с элюцией в обоих случаях также линейным градиентом концентрации СА (0,05—0,5 М). На всех трех этапах использовали один и тот же буфер: 0,05 М Трис-НСl (рН 7,5) + 15 мМ β -меркаптоэтанол + 1 мМ ЭДТА + 25% этиленгликоля (заметим, что Mg^{2+} в нем отсутствовал).

Следует отметить, что в последние годы сульфат аммония все чаще используется в качестве солевого компонента элюентов, вытесняя привычные NaCl и KCl. Это можно объяснить как мягкостью его воздействия на белки, так и удобством их осаждения из хроматографических фракций простым увеличением концентрации уже имеющейся там соли.

В качестве еще одного примера белка, отличающегося практически одинаковым сродством к ионообменникам обоих типов, т. е. четко выраженной амфотерностью, можно назвать п обратную транскриптазу из вируса мпелобластоа птиц (AMV). Проиллюстрируем это обстоятельство сопоставлением хроматографических этапов двух недавно опубликованных методов очистки данного белка.

Пример 14. Очистка обратной транскриптазы из AMV.

Метод 1 [Myers et al., 1980]. После предварительной очистки препарат вносили на короткую колонку (1 × 5 см) DEAE-целлюлозы; элюцию вели 0,3 М К-фосфатным буфером (рН 7,2), содержащим 2 мМ ДТТ, 10% глицерина и 0,2% NP-40 (вероятно, статический вариант хроматографии). На втором этапе очистку проводили в режиме динамической хроматографии с помощью точно такого же элюента, но на колонке CM-сефарозы CL-6B длиной 59 см.

Метод 2 [Golomb, Grandgenett, 1979]. Здесь хроматографическую очистку вели тоже последовательно на двух ионообменниках противоположных типов (DEAE-целлюлозе и фосфоцеллюлозе «Whatman P11»), причем в обоих случаях использовали динамический вариант элюции линейным градиентом концентрации фосфатного буфера, рН 8. Эти градиенты были почти тождественны: 0,01—0,5 М для анионо- и 0,05—0,5 М для катионообменника. Прочие добавки к буферу были идентичны (Mg^{2+} отсутствовал).

Приведенных примеров очистки белков, по-видимому, достаточно не только для того, чтобы проиллюстрировать некоторые общие положения, но и для того, чтобы обратить внимание читателя на необходимость учета индивидуальных особенностей белка в каждом случае.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Ионообменная хроматография для фракционирования смеси белков используется значительно реже, чем для их очистки. Большие молекулярные массы обуславливают замедленную диффузию белков в жидких фазах и в связи с этим — невысокую разрешающую способность метода. Для смеси небольшого числа относительно некрупных белков ионообменное фракционирование еще себя оправдывает, однако в более сложных ситуациях оно явно уступает электрофорезу и изоэлектрофокусированию. Приведем несколько примеров фракционирования белков методом ионообменной хроматографии в более или менее благоприятных ситуациях.

Пример 15. Негистоновые белки хроматина из эритроцитов пыленка [Isackson et al., 1980]. Большинство негистоновых белков хроматина имеет, как и гистоны, щелочной характер. Среди них преобладают и особенно интенсивно изучаются белки группы HMG («high mobility group»), названные так из-за своей высокой подвижности при электрофорезе. Эти белки связаны с хроматином менее прочно, чем гистоны, их экстрагируют 0,35 М раствором NaCl. Таким солевым раствором (в 0,01 М Трис-HCl, pH 7,5) их экстрагировали из 1,1 л геля хроматина (2 мг/мл по ДНК), а затем вносили на колонку фосфоделлюлозы P-11 (2×100 см), уравновешенную тем же раствором. Элюцию вели ступенчатым градиентом концентрации NaCl (0,45—0,465—0,55 М) со скоростью 20 мл/см²·ч на холоду.

На рис. 120 приведен хроматографический профиль элюции белков (участок промывки колонки не показан). В крайнем справа пике выходит примесь гистона H1, часть которого тоже экстрагируется 0,35 М NaCl (его снимали с колонки 2 М NaCl). Анализ электрофорезом в ПААГ позволил идентифицировать наиболее изученные белки этого типа: HMG-1 и HMG-2 элюируются 0,465 М NaCl, а HMG-14 и HMG-17 снимаются с колонки в 0,55 М NaCl. Но хроматография в этом случае смогла дать и кое-что дополнительно. Например, белок, выходящий на «плече» пика, элюируемого 0,465 М NaCl (названный «HMG-14А»), при электрофорезе идет вместе с HMG-14, но существенно отличается от него по аминокислотному составу.

Кстати, использование здесь довольно сильного катионообменника было вынужденным: белки хроматина нерастворимы в буфере с меньшей концентрацией соли. Недавно Торрес и соавторы описали остроумный способ обхода этого затруднения. Белки, экстрагированные из хроматина 0,35 М NaCl, сначала диализом против воды осаждали, а затем растворяли в 0,01 М Na-фосфатном буфере

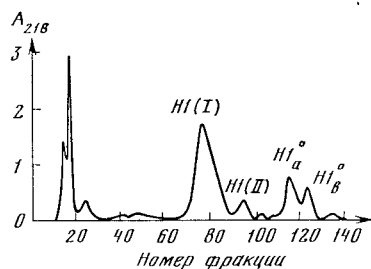
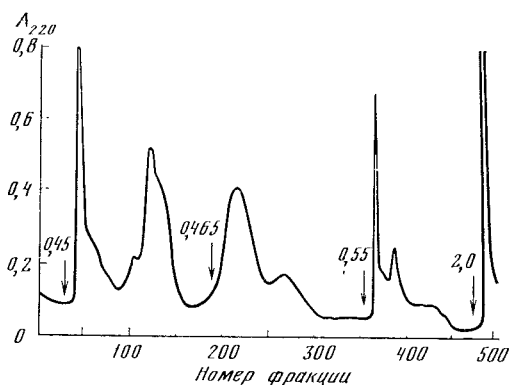


Рис. 120. Хроматография негистоновых белков хроматина из эритроцитов цыпленка на колонке фосфоселлюлозы «Whatman P-11» [Isackson et al., 1980]

Стрелки отмечают ступенчатое повышение концентрации NaCl, M

Рис. 121. Фракционирование гистонов H1 и H^{1°} из культуры клеток китайского хомячка на колонке «Bio-Rex 70» [D'Anna et al., 1981]

(рН 7,5), содержащем около 1% карбоксиметилдекстрана. Молекулы последнего связываются с белками в водорастворимые комплексы, что не мешает хроматографическому фракционированию, которое вели на обменнике «DEAE-Sephacel» в линейном градиенте концентрации NaCl (0—0,45 M) [Torres et al., 1982].

Для фракционирования гистонов — белков сильнощелочного характера и малой массы — удобно использовать слабый катионообменник «Bio-Rex 70».

Пример 16. Фракционирование гистонов H1 и H^{1°} из культуры клеток яичников китайского хомячка [D'Anna et al., 1981]. Эти гистоны экстрагировали из ядер 0,83 M HClO₄. 9,3 мг белка экстракта растворяли в 0,6 мл 8%-ного раствора гуанидинхлорида (ГХ) в 0,1 M фосфатном буфере (рН 6,8) с 0,5 mM ФМСФ и вносили на колонку «Bio-Rex 70» (1,5 × 22 см), уравновешенную тем же раствором. Элюцию вели линейным градиентом (8—14%) концентрации ГХ. Результат фракционирования представлен на рис. 121.

В аналогичных опытах было показано, что гистон H1 из разных объектов удается разделить на пять подфракций, пропорции которых меняются от объекта к объекту [Dolby et al., 1979], или что гистоны H1 и H^{1°} можно разделить на три фракции каждый [Smith, Johns, 1980]. Попутно можно отметить использование смолы «Bio-Rex 70» для извлечения гистона H1 из хроматина, растворенного в буфере низкой ионной силы. Освобожденный от H1 хроматин интересен с позиций изучения его регулярного строения, ДНК-белкового взаимодействия и др. [Marekov, Beltchev, 1981].

Недавно было описано хроматографическое отделение активной, транскрибируемой части от суммарного хроматина. Обычно такое отделение базируется на предполагаемой большей уязвимости ак-

тивного хроматина к перевариванию микрококковой нуклеазой. Однако при этом переваривании происходит диссоциация от хроматина некоторых его компонентов и нарушаются более высокие порядки структурной организации, возможно, играющие роль в активации трансляции. Авторам удавалось перевести более 95% хроматина в раствор путем дробления его во Фрэнч-прессе, за которым непосредственно и следовала ионообменная хроматография. Для нее использовали предложенный еще в 1969 г. слабый анионообменник «ЕСТНАМ-cellulose» [Peterson, Kuff, 1969]. Его можно легко синтезировать в лабораторных условиях путем присоединения Триса в сильно щелочной среде к целлюлозе типа CF-11 с помощью эпихлоргидрина.

Фрагментированный хроматин из ядер печени крысы «сажали» на колонку ЕСТНАМ-целлюлозы в 0,01 М Трис-НСl (рН 6,8) и элюировали сначала двумя ступенями (0,035 и 0,05 М Трис-НСl, рН 6,8, с добавкой 0,04 М NaCl), а затем линейным градиентом концентрации соли (до 0,54 М) с одновременным защелачиванием буфера до рН 9. Основная масса хроматина элюировалась линейным градиентом, однако на первых двух этапах элюции выходили две фракции, явно обогащенные негистоновыми белками хроматина, в частности некоторыми белками типа HMG. Эти фракции были обогащены также гетерогенными по своим размерам РНП-частицами, содержащими новосинтезированную РНК, большая часть которой еще прочно связана с хроматином (по данным центрифугирования в градиенте плотности метризамида). Между тем содержание гистонов во всех фракциях хроматина оказалось одинаковым. В хроматине из эритроцитов рано элюируемый материал не обнаруживался вовсе. Авторы полагают, что в хроматине из ядер печени рано элюируемый материал обогащен активно транскрибируемыми участками [Smith, Billett, 1982].

Довольно успешно ионообменную хроматографию применяют и для фракционирования белков рибосом. Большинство этих белков также имеет щелочной характер, но они крупнее гистонов, поэтому здесь предпочтение отдается СМ-целлюлозе. Белки рибосом весьма склонны к агрегации, что заставляет вести их хроматографическое фракционирование в присутствии 6 М мочевины.

Пример 17. Фракционирование белков 40S субъединиц рибосом рачка *Artemia salina* [Ting Shih et al., 1979]. Белки, как обычно, экстрагировали из очищенных рибосом 66%-ной CH_3COOH . Затем уксусную кислоту удаляли лиофилизацией и белки перерастворяли в 0,05 М Na-фосфатном буфере (рН 6,5) в присутствии 6 М мочевины, 1 мМ ДТТ и 0,5% метиламина. На колонке СМ-целлюлозы (1×30 см) линейным градиентом концентрации NaCl (0—0,4 М) смесь белков удавалось разделить примерно на 20 фракций (рис. 122). Конечно, по своему качеству это разделение уступает двумерному электрофорезу рибосомальных белков, но зато его можно вести в любом препаративном масштабе и нет проблемы элюции белков из геля.

Именно с такими препаративными целями белки, экстрагиро-

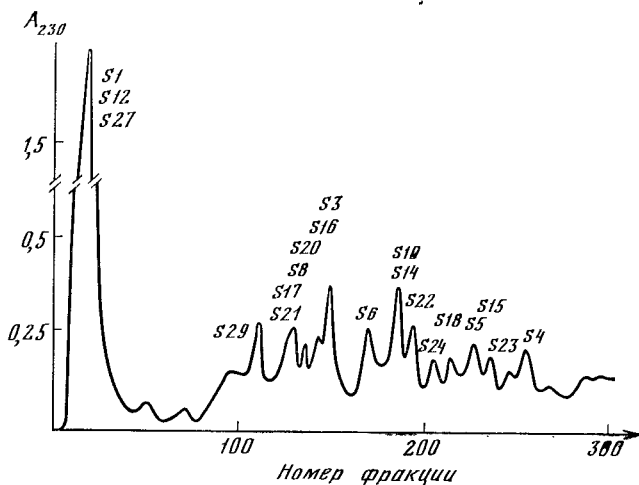


Рис. 122. Фракционирование белков 40S субъединиц рибосом рачка *Artemia salina* на СМ-целлюлозе [Ting Shih et al., 1979]

ванные 66%-ной CII_3COOH из 1,8 г рибосом *Drosophila*, фракционировали на колонке СМ-целлюлозы (5×80 см) элюцией ступенчатым градиентом концентрации LiCl (0—0,185—0,23—0,27—0,3—0,4—1 М) в 0,02 М фосфатном буфере (рН 6,5) в присутствии 6 М мочевины и 0,5% β -меркаптоэтанола. Соответственно было получено семь групп рибосомальных белков для их дальнейшего фракционирования и очистки [Chooi, 1980].

Пример 18. Аналитическое фракционирование рибосомных белков плесени *Podospora anserina* [Coppin-Raynal, 1980]. Как и в последнем примере, фракционирование рибосомных белков на СМ-целлюлозе вели в градиентах концентрации LiCl . Однако здесь работу проводили на аналитическом уровне, в колонках размером $0,6 \times 17$ см. Белки 40S субъединиц рибосом плесени фракционировали линейным градиентом 0—0,2 М LiCl , а в случае 60S субъединиц применяли градиент 0—0,3 М. Удавалось наблюдать различия в положениях хроматографических пиков соответственных белков, экстрагированных из рибосом диких и мутантных штаммов плесени (метка белков по ^3H и ^{14}C и совместная хроматография).

Этим мы ограничим число примеров использования ионообменной хроматографии для фракционирования белков (при обычных давлениях). Читатель, конечно, обратил внимание на то, что во всех примерах фигурировали щелочные белки. Это отвечает реальной хроматографической практике. Дело здесь не в каких-либо хроматографических преимуществах катионообменников или щелочных белков, а в различии чисто биологических ситуаций.

Щелочные белки в большинстве своем связаны с нуклеиновыми кислотами — они участвуют в процессах транскрипции и трансляции. В комплексе с НК их легко отделить от других белков клетки, затем избирательно экстрагировать и таким образом получить

исходную смесь, состоящую из относительно небольшого числа компонентов. Кроме того, многие из них сравнительно невелики по размерам. Это обеспечивает ситуацию, благоприятную для хроматографического фракционирования. Что же касается кислых белков цитоплазмы, то здесь все обстоит как раз наоборот, и потому ионообменная колоночная хроматография, играющая центральную роль в процессах очистки этих белков, довольно редко и лишь на поздних этапах применяется для их фракционирования.

Впрочем, такое положение может в недалеком будущем измениться в связи с наметившимися возможностями распространения на хроматографию белков современных высокоэффективных методов, основанных на использовании особо мелкозернистых, гомогенных и вместе с тем крупнопористых ионообменников.

Этой перспективе посвящен следующий раздел, а здесь отметим, что в случае хроматографии на уровне микрограммовых количеств препарата следует принять меры для уменьшения потерь белков за счет сорбции их на материале колонки — стекле или пластике. С этой целью в элюент можно вводить глицерин (до 50%) или Тритон X-100 (до 0,2 мМ). Для стекла при низкой ионной силе элюента лучше использовать глицерин, при высокой — Тритон X-100. Впрочем, этот выбор зависит и от природы белка [Suelter, DeLuca, 1983].

ИОНООБМЕННАЯ ЖХВД БЕЛКОВ

В этой области хроматографии делаются только первые шаги. В 1980 г. были опубликованы результаты модельных экспериментов по отработке условий ионообменной ЖХВД белков на крупнопористом продажном анионообменнике на основе силикагеля «Synchronak AX-300». На колонку размером $0,41 \times 25$ см вносили по 10 мг овальбумина или БСА. Элюцию вели линейным градиентом концентрации CH_3COONa (0—0,5 М) в 0,02 М Трис-ацетатном буфере (pH 8) со скоростью около 100 мл/см²·ч [Vanecsek, Regnier, 1980].

Двумя годами позже эти же авторы описали приготовление анионообменника специально для ЖХВД белков путем ковалентной посадки слоя полиэтиленimina ($M = 600$) на весьма крупнопористые продажные силикагели «Lichrospher Si 1000» и «Lichrospher Si 4000». В поры диаметром 1000 Å легко входят белки с $M = 100\,000$ и выше. На колонке длиной всего лишь 5 см за 40 мин в аналогичных описанном в предыдущей работе модельных экспериментах смесь продажных препаратов овальбумина и БСА разделялась на восемь пиков (пять и три соответственно). Отметим одну своеобразную особенность этого анионообменника. Молекулы полиэтиленimina на поверхности пор силикагеля располагались не монослоем, а образовывали пространственную сетку толщиной 60—80 Å. Для белков поры этой сетки недоступны, но низкомолекулярные ионы могут в них проникать, чем обеспечивается высокая емкость обменника для таких ионов [Vanecsek, Regnier, 1982].

Специалисты фирмы «J. T. Baker» сообщили о разработке аналогичного ионообменника. Полиэтиленмин они закрепляли на силикагеле с диаметром пор 330 Å и размером зерна 5 мкм. В модельных опытах разделение белков на колонке размером 0,46 × 25 см осуществляли элюцией линейным градиентом концентрации (0,025—0,5 М) К-фосфатного буфера (pH 6,8) со скоростью 1 мл/мин. Обменник получил название «BAKER-BOND Wide-Pore-silica gel», что, по-видимому, указывает на намерение фирмы включить его в ассортимент своей продукции [Flashner et al., 1983].

Недавно группой авторов с участием Регниера была предложена методика приготовления слабого катионообменника для ЖХВД белков на основе крупнопористого силикагеля («Vydac TP 201»; 300 Å). Обработка идет в три этапа. Сначала с помощью 2-карбометоксипентрихлорсилана на силикагель «пришивают» метоксигруппы, потом посредством их замещения по концевым аминогруппам присоединяют полиэтиленмин. Взаимодействие внутренних иминогрупп в разных цепях этого полимера образует прочно фиксированную сетку на поверхности носителя. Наконец, с помощью дигликолевого ангидрида по концевым и промежуточным атомам азота полиэтиленмина короткими цепочками присоединяются карбоксиметильные группы. Получается жесткий, крупнопористый обменник для ЖХВД, названный авторами «CM-polyamide column». По своим характеристикам он сходен с обычными слабыми катионитами CM-типа [Gupta et al., 1983]. Описано разделение на таком обменнике за 25 мин десяти различных гемоглобинов больных с различными заболеваниями крови [Gupta, Hanash, 1983].

В предыдущем разделе мы упоминали рекламные сведения фирмы «LKB» о возможностях ионообменной хроматографии смеси пептидов на новых ионообменниках типов «2133 UltroPak TSK 545 DEAE» и «...TSK 535 CM». О фракционировании белков на этих обменниках пока не сообщалось, но можно думать, что такие данные в недалеком будущем должны появиться.

Выбору оптимального режима элюции для фракционирования белков типа овальбумина на аналогичном анионообменнике «TSK GEL IEX-545 DEAE SIL» (фирма «Toyo Soda») посвящена работа [Kato et al., 1982]. Элюцию вели градиентом концентрации соли (0—0,2 М NaCl) в 0,1 М Трис-HCl (pH 7,5).

СИСТЕМА ДЛЯ БЫСТРОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ ФИРМЫ «PHARMACIA»

Мы уже не раз обращали внимание читателя на эту многообещающую новую систему («Pharmacia FPLC System») — и в гл. 3 при описании специально разработанной аппаратуры, рассчитанной на умеренные давления, и в данной главе, говоря о замечательных особенностях новых ионообменников «Mono Q» и «Mono S» и приводя примеры их использования для фракционирования пептидов. Сейчас можно дополнить это несколькими примерами (тоже почерпнутыми из рекламных материалов фирмы) фракционирования

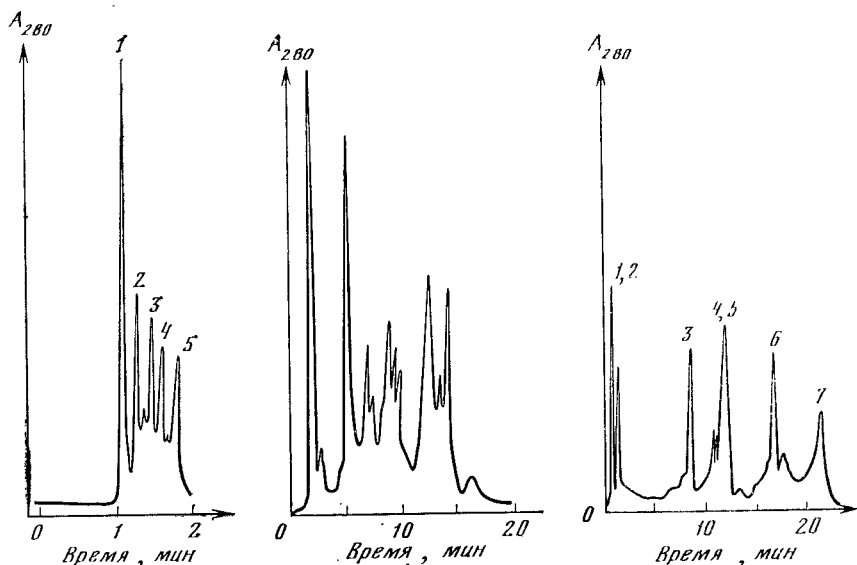


Рис. 123. Разделение модельной смеси белков на анионообменнике «Моно Q»
1 — карбангидраза; 2 — кональбумин; 3 — α -лактальбумин; 4 — БСА; 5 — β -лактоглобулин В

Рис. 124. Фракционирование белков яда *Crotalus atrox* на анионообменнике «Моно Q»

Рис. 125. Фракционирование ферментов из гомогената мышцы цыпленка на катионообменнике «Моно S»

1 — креатинкиназа; 2 — фосфоглицеромутаза; 3 — триозофосфатизомераза; 4 — альдолаза; 5 — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; 6 — лактатдегидрогеназа; 7 — эндолаза

белков. Полученные результаты производят выгодное впечатление — разделение белков по качеству и скорости не уступает фракционированию, привычному для относительно коротких пептидов.

Рис. 123 иллюстрирует разделение модельной смеси пяти белков (угольной ангидразы, кональбумина, α -лактальбумина, БСА и β -лактоглобулина) на анионообменнике «Моно Q» посредством градиентной элюции (0—0,35 М NaCl в 0,05 М Трис-HCl, pH 8). Стоит обратить внимание на то, что фракционирование занимает всего лишь 2 мин!

На рис. 124 представлен хроматографический профиль фракционирования белков яда *Crotalus atrox* на том же самом анионообменнике. Элюцию проводили градиентом концентрации NaCl (0—0,35 М) в 0,02 М растворе триэтаноламина при pH 7,5, но на этот раз — с вдесятеро меньшей скоростью (1 мл/мин). На профиле, полученном за 20 мин, можно хорошо различить не менее 10 белковых пиков. Недавно описано быстрое фракционирование белков мочи с целью диагностики почечных заболеваний [Lindblom et al., 1983].

На рис. 125 представлены результаты разделения белков из гомогената мышцы цыпленка на катионообменнике «Моно S» с помощью солевого градиента (1,75 мМ — 0,245 М NaCl) в 0,05 М MES-буфере, pH 6. Показано расположение ряда обычных мышечных ферментов.

Выбору подвижной фазы для ионообменной ЖХВД белков была посвящена недавняя работа Копацевича и Регниера. Они исследовали влияние pH и природы соли на время задержания и разрешение компонентов модельной смеси белков на сильных («Моно Q», «Моно S») и слабых («Synchronapak AX-300») ионообменниках. Выводы работы качественно подтверждают закономерности, которые были подробно описаны выше для ионообменной хроматографии при обычных давлениях. Заслуживает упоминания тот факт, что разрешение пиков и выходы белков, как правило, оказывались лучше на сильных анионообменниках, чем на слабых (для катионитов данные противоречивы). Авторы объясняют это лучшей кинетикой десорбции, что в условиях быстро протекающего процесса ЖХВД может иметь существенное значение [Kopaciewicz, Regnier, 1983].

Годом раньше в обзорной статье, посвященной итогам первых лет становления ионообменной ЖХВД белков, Регниер, в частности, заметил, что для максимальной загрузки колонки малыми белками (типа ангидразы угольной кислоты) оптимальный размер пор лежит вблизи 100 Å, для гемоглобина и БСА — около 300 Å, а для крупных белков с молекулярной массой в несколько тысяч Дальтон нужно использовать колонки с порами диаметром 500 или даже 1000 Å. Оптимальный размер пор обуславливается, с одной стороны, необходимостью свободного проникновения в них молекул белка, а с другой — желательностью увеличения рабочей поверхности сорбента, которая для мелкопористой матрицы, естественно, больше, чем для крупнопористой. В соответствии с тем, что уже отмечалось нами ранее, Регниер обращает внимание на необходимость снижения скорости элюции до 0,1 мм/с и менее (не более 36 мл/см²·ч) [Regnier, 1982].

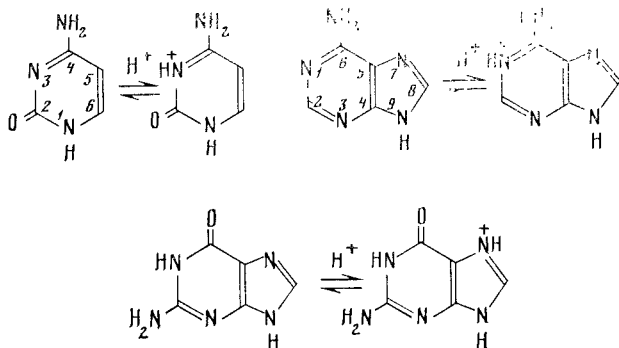
ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ, НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ

НУКЛЕИНОВЫЕ ОСНОВАНИЯ

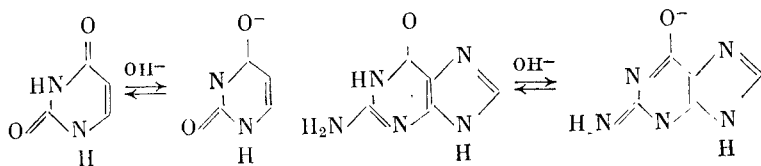
Фракционирование оснований можно вести по заряду в кислой или щелочной среде и по степени гидрофобности. Как уже упоминалось, гидрофобное взаимодействие пуринов с матрицей ионообменника на основе полистирола примерно втрое сильнее, чем у пиримидинов. Различия силы ионных взаимодействий обусловлены разницей значений pK ионизации некоторых атомов азота, входящих в состав гетероциклов.

При понижении pH среды в первую очередь протонируется атом азота, стоящий в третьем положении ядра цитозина (N_3). Эта

ионизация (в растворах умеренной ионной силы) характеризуется значением $pK = 4,5$. Аналогичному процессу протонирования N_1 аденина отвечает несколько меньшее значение pK (4,1). В гуанине



при закислении среды протонируется N_7 — атом азота в имидазольном кольце ($pK = 3,2$). Урацил в кислой среде остается незаряженным. В щелочной среде происходит отрыв протона и появление отрицательного заряда на атомах азота пиримидиновых колец урацила и гуанина. Тимин в отношении ионизации ведет себя точно так же, как урацил. Оба процесса характеризуются одним и тем же значением pK (9,5):



Заметим, что значения pK уменьшаются в пределах 0,2—0,5 ед. pH при переходе от оснований к дезоксирибонуклеозидам и далее к рибонуклеозидам. Кроме того, они довольно существенно зависят от ионной силы: при низкой ионной силе уменьшаются почти на единицу, а при высокой — увеличиваются примерно на 0,4 ед. pH .

Однако с позиций ионообменной хроматографии самое существенное состоит в том, что соотношение между значениями pK при этом изменяется мало. Иными словами, в слабокислой среде производные цитозина характеризуются наибольшим средним положительным зарядом (т. е. наибольшей долей положительно заряженных молекул). Положительный заряд производных аденина меньше, производных гуанина — еще меньше, а урацил или тимин и их соответствующие нуклеозиды остаются незаряженными.

В щелочной среде такой расчлененной для всех оснований градации зарядов, очевидно, создать нельзя, поэтому для разделения нуклеиновых оснований методом ионообменной хроматографии целесообразно использовать мелкопористые катионообменники и вести элюцию в кислой среде.

Такого рода фракционирование вошло в число первых примене-

ний ионообменной хроматографии в биохимии, датированных еще началом 50-х годов. Нуклеиновые основания разделяли на смоле «Dowex 50» (H^+), нанося и изократически элюируя их смесь 2 н. HCl . В этих условиях практически без задержки с колонки выходил урацил, за ним следовали цитозин, гуанин и значительно позднее — аденин. Очевидно, что цитозин выходил раньше, чем аденин и даже гуанин, за счет того, что пуриновые основания задерживались сильным гидрофобным взаимодействием с полистирольной матрицей. Хотя в 2 н. HCl различия средних положительных зарядов

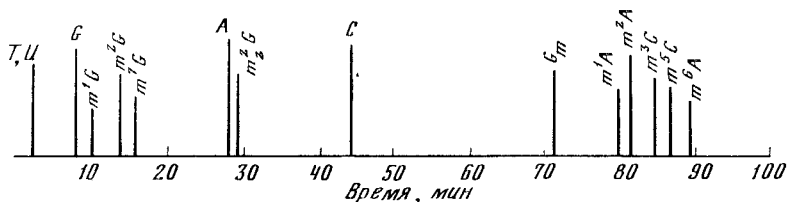


Рис. 126. Порядок элюции обычных и метилированных оснований при их фракционировании на колонке пленочного катионообменника «Zirax SCX» [Yuki et al., 1979]

оснований не могут быть велики, этих различий все же оказывалось достаточно для отделения аденина от гуанина. Описываемая система хроматографии была еще столь несовершенна, что для разделения всего лишь четырех нуклеиновых оснований через колонку пришлось пропускать 120 ее объемов элюента. Демущкин и Пляшкевич разделяли основания на полистирольном катионообменнике «Aminex A-7» изократической элюцией при pH 3,4 (1 М раствор Na_2HPO_4 , титрованный $HCOOH$). В этих условиях наиболее выражены различия зарядов оснований. Влияние гидрофобных взаимодействий авторы подавляли, вводя в элюент 20 % этанола и проводя элюцию при температуре 70° [Demushkin, Plyashkevich, 1978].

Значительный интерес представляет фракционирование модифицированных оснований, по большей части метилированных («минорных»). Эти основания отличаются повышенной гидрофобностью, особенно некоторые из них — сложномодифицированные. Юки и соавторы разделяли минорные основания на сильном силикагелевом катионообменнике пленочного типа («Zirax SCX») в очень длинной колонке (0,21 × 150 см) под давлением 55 атм (хроматограф «Du-Pont 830»). Изократическую элюцию вели 0,01 М NH_4 -фосфатным буфером (pH 4,6) при температуре 40°. Гидрофобные взаимодействия при использовании обменника на основе силикагеля играют второстепенную роль, и обычные нуклеиновые основания элюируются в порядке увеличения средних зарядов при pH 4,6: урацил (тимин)—гуанин—аденин—цитозин. Тем не менее задержка метилированных оснований, по-видимому, обусловлена именно вкладом метильных групп в гидрофобное взаимодействие с матрицей. Последовательность выхода оснований показана на рис. 126 [Yuki et al., 1979].

Любопытно отметить особенно сильный гидрофобный эффект метилирования гуанина по кислороду рибозы и то обстоятельство, что миноры m^7G и m^1A не выделяются из соответствующих групп метилированных производных гуанина и аденина, хотя и несут, как известно, стабильный положительный заряд. Дело в том, что этот заряд располагается как раз в том же месте, что и при протонировании оснований в кислой среде. И хотя при pH 4,6 оно происходит отнюдь не на 100%, но из-за стерических условий, определяющих силу взаимодействия с ионообменником, замена протона на CH_3 -группу является невыгодной.

НУКЛЕОЗИДЫ

Рибонуклеозиды можно разделять на катионообменнике типа AG50W $\times$ 4 изократической элюцией 0,3 М NH_4 -формиатным буфером, pH 8,9. Аденозин и гуанозин элюируются позже, чем уридин и цитидин, за счет гидрофобных взаимодействий. Между тем уридин выходит раньше, чем цитидин, а гуанозин — раньше, чем аденозин, уже за счет отрицательных зарядов уридина и гуанозина при щелочном значении pH.

Изящный прием позволяет на такой же колонке фракционировать дезоксирибонуклеозиды в присутствии рибонуклеозидов. Для этого используют элюцию 0,1 М NH_4 -боратным буфером, pH 9,2. Остатки борной кислоты, образуя комплексы с остатками рибозы, сообщают всем рибонуклеозидам дополнительный отрицательный заряд, поэтому они выходят в свободном объеме колонки. Дезоксирибонуклеозиды недоступны для такого рода модификации и фракционируются в соответствии с зарядами и гидрофобностью своих оснований, как было описано выше для рибонуклеозидов [Morgan, Werkheiser, 1978].

НУКЛЕОТИДЫ И КОРОТКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

Наличие остатков фосфорной кислоты у нуклеотидов и олигонуклеотидов диктует использование для их фракционирования анионообменников. Элюцию можно вести градиентом концентрации соли, например NH_4Cl . При щелочных значениях pH элюента во фракционировании участвуют и отрицательные заряды урацила (тимина) и гуанина. Для уменьшения объема элюции имеет смысл снизить уровень гидрофобного взаимодействия оснований с полистирольным обменником путем введения в элюент 20—40% этанола. Астериадис и соавторы таким образом фракционировали нуклеотиды и короткие олигонуклеотиды, образующиеся при исчерпывающем гидролизе РНК панкреатической РНКазой, на колонке «Dowex 1 $\times$ 2» (—400 МЭШ) размером 0,3 $\times$ 60 см. Элюцию вели линейным градиентом (400 мл) 0—1 М NH_4Cl при pH 10 в 20%-ном этаноле со скоростью 12 мл/ч. Элюируется сначала СМР, затем АМР

(С и А не заряжены, но различаются по степени гидрофобности). За ними следуют UMP и GMP — здесь, помимо гидрофобности, играют роль отрицательные заряды U и G. Далее выходят динуклеотиды в том порядке, который диктуется зарядами входящих в их состав оснований: AC—GC—AU—GU (последнее основание после гидролиза панкреатической РНКазой — всегда пиримидин). Затем элюируются тринуклеотиды также в соответствии с пропорцией в их составе незаряженных и отрицательно заряженных оснований, начиная с AAC (этот тринуклеотид выходит даже раньше динуклеотида GU) и кончая GGU. Разделение занимало около 20 ч [Asteriadis et al., 1976].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖХВД

В принципе аналогичная система фракционирования, но на анионообменной смоле «Aminex A-25» (диаметр гранул $17,5 \pm 2$ мкм) под давлением 120 атм позволила за 3 ч успешно разделить основания, рибонуклеозиды, рибонуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты. Колонку размером $0,48 \times 70$ см уравнивали 0,07 М Na-боратным буфером (рН 9,15), содержащим 0,045 М NH_4Cl и 2,5% этанола. В течение 15 мин элюцию вели тем же буфером (этанол помогает снять со смолы основания), а затем в течение 2,5 ч подавали линейный градиент (110 мл) от указанных начальных условий до 0,01 М Na-боратного буфера (рН 8,8) с 0,5 М NH_4Cl . Температура элюента 65° [Nissinen, 1980]. На рис. 127 представлена несколько упрощенная картина разделения. Общий порядок выхода четырех главных оснований и их производных такой же, как в предыдущем случае: C—A—U—G. Благодаря комбинации заряда и гидрофобности гуанина GMP элюируется позже, чем CDP, а GDP — позже, чем CTP. АТР выходит несколько позже, чем UTP, так как при наличии трех отрицательно заряженных фосфатов заряд урацила сжывается в меньшей степени, чем гидрофобность аденина.

Элюцию нуклеозидмоно-, ди- и трифосфатов с анионообменной смолы можно вести и нарастающей концентрацией достаточно сильной кислоты (вместо соли). При этом происходит частичная нейтрализация остатков фосфорной кислоты, а в ионном взаимодействии начинает играть роль отталкивание от обменника положительно заряженных оснований C, A и G.

Аксельсон и соавторы пользовались для этой цели градиентом концентрации трифторуксусной кислоты (ТФУ) и макропористым полистирольным анионообменником AGMP-1 (в ТФУ-форме), которым набивали стальную колонку размером $0,46 \times 15$ см. К преимуществам ТФУ в качестве элюента в этом случае относится гидрофобность и возможность удаления ее из фракций упариванием или лиофилизацией [Axelson et al., 1981].

Описано быстрое (за 20 мин) фракционирование мононуклеотидов с помощью ЖХВД на продажном анионообменнике на силикагелевой основе (RSIL AN) градиентом концентрации ортофосфорной кислоты (0,01—1 М) при фиксированных значениях рН — 2,

типа «Dowex 1×2». Для нейтрализации избыточного отрицательного заряда фосфатов разделение вели в сильно кислой среде (0,01 н. HCl). Элюцию осуществляли ступенчатым градиентом концентрации LiCl (0,0125—1 М). Использование этой соли обусловлено хаотропным эффектом иона Li^+ , ослабляющим неспецифическую сорбцию олигонуклеотидов на полистироле [Miura, Hayashi, 1967].

Существенное усовершенствование в методику хроматографии олигонуклеотидов ввел Тенер, предложивший включить в состав элюента 7 М мочевины. Это позволило подавить агрегацию крупных молекул олигонуклеотидов и их неспецифическую сорбцию (за счет водородных связей) на полисахаридных матрицах DEAE-целлюлозе и DEAE-сефадексе, которые благодаря этому удалось успешно использовать для фракционирования олигонуклеотидов. При нейтральном pH в присутствии 7 М мочевины элюцией линейным градиентом концентрации NaCl (0—0,3 М) Тенер успешно разделял олигонуклеотиды по длине, а в кислой области pH, используя вклад положительного заряда оснований, олигонуклеотиды одинаковой длины — по составу. При pH 4—4,4 разделение шло главным образом по содержанию остатков цитозина и аденина (они приобретают заметный заряд), а при pH 2,7 — по содержанию урацила, который остается при этом незаряженным. Элюцию вели градиентом концентрации NaCl (0,05—0,15 М) [Tener, 1967].

Практически без изменений метод Тенера используется до сих пор. Недавно, например, на колонке DEAE-целлюлозы ($150 \times 0,3$ см), уравновешенной 0,02 М Трис-HCl (pH 7,2) с 7 М мочевиной, элюцией линейным градиентом концентрации NaCl (0—0,33 М) разделяли олигонуклеотиды, полученные в результате гидролиза тРНК Т1-рибонуклеазой [Salas, Dirheimer, 1979].

Аналогичный подход был недавно использован и в варианте ЖХВД. Олигонуклеотиды РНКазного гидролизата (вплоть до 10-членных) фракционировали по длине в приборе «Spectra Physics 3500» на анионообменной пленочной смоле «AL Pellionex WAX» в колонке размером $0,21 \times 50$ см. Элюцию вели линейным градиентом концентрации NaCl (0—1 М) в 0,01 М Трис-HCl-буфере (pH 7), содержащем 7 М мочевины, при 23° со скоростью 1,2 мл/мин. Все разделение занимало менее часа [Vandenberghe et al., 1980].

Очистка и фракционирование длинных олигонуклеотидов (до 17 остатков) методом ионообменной ЖХВД требует принятия мер, предотвращающих образование локальных вторичных структур за счет комплементарных участков. Для этой цели было предложено вести элюцию с колонки «Partisil 10-SAX» линейным градиентом концентрации фосфатного буфера (0—0,3 М), pH 6, в 30%-ном (а в некоторых случаях 60%-ном) растворе формамида при комнатной температуре [Newton et al., 1983].

Описано фракционирование Т1-РНКазного гидролизата тРНК на аминопропилсиликагеле («Zorbax NH_2 ») в приборе «Du-Pont 850LC» (колонка $0,45 \times 25$ см) с элюцией сложным градиентом (0,05—0,9 М KH_2PO_4 , pH 4,5, и 0—10% метанола) при 35° со скоростью 2 мл/мин [Mc Laughlin, et al., 1981]. Позже в таком же ва-

рианте элюции на аналогичном обменнике «APS-Hypersil» очищали и анализировали олигонуклеотиды, синтезированные *in vitro* с помощью фермента Т4 РНК-лигазы [McLaughlin, Romaniuk, 1982].

Для хроматографии относительно длинных (до 20 остатков) олигонуклеотидов было предложено пришивать на силикагелевую матрицу полиэтиленимин (PEI), подобно тому как было описано выше для хроматографии белков. Здесь нет нужды образовывать толстый слой полиэтиленимина, поэтому модификация осуществлялась проще. Через силикагелевую колонку прокачивали 10%-ный раствор PEI в метаноле, потом подавали в нее раствор сшивающего агента (диглицидилэтиленгликсия), оставляли его в колонке на 12 ч при 20°, а избыток отмывали метанолом. Элюцию олигонуклеотидов с такой колонки вели линейным градиентом концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0—0,75 М) в 0,05 М К-фосфатном буфере (рН 6) в течение часа [Lawson et al., 1983].

Возможности ионообменной хроматографии целых молекул нуклеиновых кислот, естественно, ограничены кругом сравнительно низкомолекулярных НК (тРНК, рибосомальные 5S РНК, ядерные РНК); в последнее время к ним присоединились и плазмиды бактерий. Это ограничение обусловлено чересчур прочной многоточечной связью высокомолекулярных НК даже со слабыми анионообменниками.

Наибольший интерес представляет фракционирование тРНК ввиду многочисленности вариантов первичной структуры этих молекул (включая изоакцепторные) при очень незначительных вариациях длины полинуклеотидных цепей. В конце 60-х годов фракционирование тРНК осуществляли только за счет ионного обмена, опираясь на различие нуклеотидного состава и соответственных вкладов положительно заряженных (в кислой области рН) оснований. Например, именно в таком плане проводили фракционирование тРНК на DEAE-сефадексе А-50 [Nishimura, Weinstein, 1969].

Однако вскоре стало ясно, что разрешающей способности чисто ионообменной хроматографии для этой цели недостаточно. Была обнаружена возможность использовать еще и различия в степени гидрофобности молекул тРНК, зависящей как от их нуклеотидного состава (включая сюда число и особенности гидрофобных «минорных» нуклеотидов), так и от третичной структуры. Один из вариантов такой возможности был описан при рассмотрении обратнотазовой гидрофобной хроматографии. Здесь мы познакомимся с иным подходом, когда ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе дополняется гидрофобным взаимодействием молекул тРНК с матрицей целлюлозы, специально «гидрофобизированной» посредством химической присадки на нее остатков бензойной кислоты (до 2,5 остатков на 1 остаток глюкозы). Модификацию вели обработкой волокнистой DEAE-целлюлозы хлористым бензоилом в безводном пиридине. Модифицированный таким образом обменник получил название бензоилированной целлюлозы («BD-cellulose»). Фракционирование вели в градиенте концентрации NaCl, иногда с добавкой этанола. Разрешающая способность метода значительно выиграла

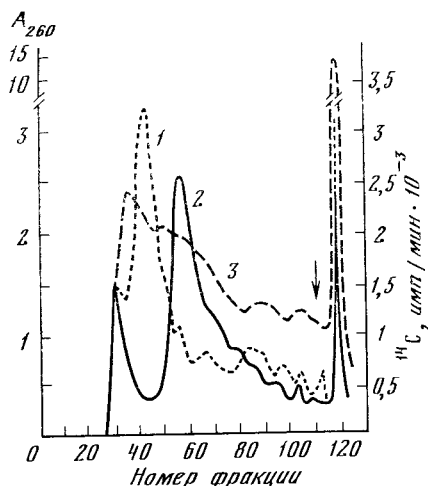


Рис. 128. Препаративное разделение изоакцепторных тРНК на колонке полистирольной смолы «Amberlyst A-21» [Osterman, 1971]

1 — тРНК^{Phe}; 2 — тРНК^{Val}; 3 — A_{260}

оставляет желать лучшего из-за зонлирования целлюлозы.

Мною в 1971 г. было предложено заменить ВД-целлюлозу для фракционирования тРНК крупнопористой полистирольной анионообменной смолой «Amberlyst A-21». В этом случае заведомо воспроизводимая степень гидрофобности обменника обеспечивается использованием полистирольной матрицы. Как и DEAE-целлюлоза, «Amberlyst A-21» является слабым анионообменником. Крупнопористая структура наряду с жесткостью обеспечивает ему весьма высокую емкость для тРНК — до 30 мг на 1 мл упакованного обменника. Хорошее препаративное разрешение изоакцепторных тРНК удалось получить при загрузке 600 мг суммарной тРНК на колонку объемом 100 мл (рис. 128). Элюцию проводили вогнутым градиентом концентрации NaCl (0,75—1,3 М) в 0,05 М Na-ацетатном буфере, pH 4,5 [Osterman, 1971]. По существу, этот же подход был использован недавно при фракционировании изоакцепторных тРНК хроматографией при высоком давлении на полистирольном анионообменнике «Aminex A-28» [Roe, et al., 1979]. Разумеется, в этом случае взаимодействие тРНК с обменником происходило на поверхности гранул диаметром около 40 мкм.

В главе, посвященной распределительной хроматографии, описано успешное фракционирование тРНК на колонках сефарозы в снижающем градиенте концентрации сульфата аммония. Метод весьма эффективен, но последующее обессоливание связано с некоторыми трудностями. Осаждение этанолом непригодно, так как

по сравнению с хроматографией на обычной DEAE-целлюлозе. Дальнейшее его развитие в целях препаративной очистки индивидуальных тРНК было связано с возможностью придания самим молекулам очищаемой тРНК повышенной гидрофобности путем избирательного aminoacyлирования и присоединения по остатку аминокислоты нафтойной кислоты из нафтоксиуксусного эфира оксисукцинимиды. Модифицированные молекулы aminoacyл-тРНК снимались с ВД-целлюлозы только совместным действием 1 М NaCl и 20% этанола, после того как все неaminoacyлированные тРНК из исходной смеси элюировали 1 М NaCl [Gillam, Tener, 1971]. ВД-целлюлоза до сих пор выпускается в виде готового препарата, однако воспроизводимость ее характеристик от партии к партии

трудности контроля степени бен-

сульфат аммония осаждается вместе с тРНК, диализ идет медленно, а гель-фильтрация связана с увеличением объема препарата и в полупрепаративных вариантах очистки тРНК требует использования больших колонок. Недавно пионеры разработки методов фракционирования тРНК Гиллам и Тенер сообщили о неожиданном факте: фракции тРНК после колонки агарозы легко сорбируются на небольшую колонку DEAE-целлюлозы, уравновешенную 2 М раствором сульфата аммония (при pH 4,5). Казалось бы, высокая концентрация соли должна препятствовать задерживанию тРНК на обменнике. По-видимому, первоначальная сорбция тРНК происходит так же, как на агарозе, за счет гидрофобных взаимодействий, причем не только с целлюлозой, но и с этильными группами модификатора (чистая целлюлоза в тех же условиях тРНК сорбирует слабо). Затем сульфат аммония можно вымыть из колонки (0,3 М NaCl и 10 mM MgCl₂ в том же 0,05 М Na-ацетатном буфере, pH 4,5). тРНК при этом остается на колонке, связываясь с DEAE-целлюлозой нормальными ионными связями. Ее, как обычно, можно в небольшом объеме снять 1 М раствором NaCl и затем осадить этанолом [Gillam, Tener, 1980].

В предыдущих главах был приведен целый ряд хроматографических вариантов очистки ДНК плазмид. Ее можно осуществить и с помощью ионообменной хроматографии. Экстрагированную из *E. coli* фенолом и хлороформом суммарную фракцию нуклеиновых кислот вносили прямо на колонку DEAE-целлюлозы, уравновешенную 0,1 М NaCl в 0,05 М Трис-HCl (pH 7,5) с 5 mM ЭДТА. Затем колонку элюировали 1,5 М NaCl. Плазмидная ДНК выходила с колонки вместе с относительно низкомолекулярной РНК, а ДНК бактерии-хозяина оставалась на колонке, где благодаря своим размерам сорбировалась очень прочно. РНК разрушали обработкой рибонуклеазой, а плазмидную ДНК очищали повторной обработкой фенолом и хлороформом [Wieringa et al., 1979]. Метод подкупает простотой, однако он расточителен — использованный обменник, по-видимому, регенерировать трудно. Кроме того, такой подход вряд ли пригоден для очистки крупных плазмид, которые тоже окажутся слишком прочно связанными с DEAE-целлюлозой.

Недавно было проведено разделение рестриктивных фрагментов ДНК ионообменной HXBD на колонках типов «TSK GEL IEX-545 DEAE SIL» (10 мкм, 250 Å) и «TSK GEL IEX-645 DEAE» (10 мкм, 1000 Å). Элюцию вели линейным градиентом концентрации (0,3—0,45 М) NaCl (180 мл) в 0,01 М Трис-HCl (pH 7,4), содержащем 0,1 mM ЭДТА, с колонок размером 0,6 × 15 см при скорости 1 мл/мин. Для 22 Hae III-фрагментов плазмиды PBR 322 удалось получить 16 пиков. Не разделяются между собой группы относительно близких по длине фрагментов: 192, 213 и 234 пары оснований, 434, 458, 504, 540 и 587 пар оснований. Разделение фрагментов, имеющих менее 100 пар оснований, лучше проводить на колонке «IEX-545 DEAE», а тех, которые содержат более 200 пар, — на колонке «IEX-645 DEAE». Калибровочный график можно использовать для определения размера неизвестного фрагмента ДНК [Kato et al., 1983].

ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИЕ

Недавно специалисты фирмы «Pharmacia» разработали новый вариант ионообменной хроматографии, названный «хроматофокусированием». Подобно изоэлектрическому фокусированию (ИЭФ), разделение компонентов смеси, например белков, базируется здесь на различии значений pI этих компонентов, причем чувствительность нового метода почти не уступает чувствительности ИЭФ: удается разделить белки, изоэлектрические точки которых отличаются друг от друга на 0,05 ед. pH . Вместе с тем новый метод, подобно другим методам колоночной хроматографии, не накладывает принципиальных ограничений на количество исходного препарата: в обычных колонках лабораторного типа можно фракционировать сотни миллиграммов белковой смеси. Приводимые в рекламных материалах фирмы «Pharmacia» экспериментальные данные по применению хроматофокусирования выглядят весьма убедительно. По состоянию на конец 1983 г. публикации в периодической научной литературе, описывающие использование нового метода, еще немногочисленны, однако сомневаться в его перспективности не приходится. Ввиду этого имеет смысл разобраться в сущности процесса хроматофокусирования и возможностях его использования.

КОЛОНКИ ДЛЯ ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИЯ

В основе фракционирования при хроматофокусировании лежит процесс ионообменной хроматографии, и неподвижная фаза представляет собой, как обычно, гранулированную крупнопористую гидрофильную матрицу «Sephacrose CL-6B» с закрепленными на ней ионогенными группами. На данном этапе фирма выпускает для хроматофокусирования только обменники, несущие положительные заряды. От обычных анионообменников, как мы увидим ниже, их отличает необходимость выполнения двух условий. Во-первых, ионогенные группы должны обладать хорошо выраженной буферной способностью. Химическая структура обменников фирмой не опубликована, но можно предположить, что это должны быть остатки слабых оснований. Во-вторых, высокая и (что особенно важно) примерно одинаковая буферная емкость обменника должна поддерживаться в широких диапазонах pH (4—9 или 8—11), что заставляет предположить использование совокупности большого числа различных ионогенных групп с разными pK в одном обменнике. Отсюда и наименования фирменных обменников — «PBE 94» и «PBE 118» («Polybuffer exchangers»); мы их будем называть «полибуфер-ионообменниками». Основным фактором, управляющим сорбцией и десорбцией компонентов фракционируемой смеси с такого ионообменника, является изменение pH подвижной фазы. В этом можно усмотреть сходство с обычной ионообменной хроматографией, когда элюцию осуществляют градиентом pH элюирующего буфера. Однако сходство это поверхностное. В процессе обычной элюции градиентом pH на

колонку подается буфер с постепенно изменяющимся рН, который не претерпевает изменений в самой колонке. Если учесть, что свободный объем колонки обычно во много раз меньше, чем объем элюции вещества, то в первом приближении можно считать, что в каждый данный момент элюции вся подвижная фаза колонки имеет примерно одинаковое значение рН.

Иное дело при хроматофокусировании. Здесь на колонку в процессе всей элюции подается буфер с неизменным рН, и тем не менее рН подвижной фазы по высоте колонки оказывается существенно неодинаковым. Это происходит за счет участия в определении рН элюента буферных свойств ионогенных групп обменника. Диапазон изменения рН по высоте колонки может составлять несколько единиц. В процессе элюции распределение рН вдоль колонки медленно изменяется. Первоначально ее уравнивают щелочным буфером, а во время элюции подают кислый буфер неизменного состава. Благодаря буферному эффекту ионогенных групп обменника происходит постепенное, продвигающееся сверху вниз закисление жидкой фазы, что составляет основу фракционирования. Постараемся представить себе, чем обусловлено такое изменение.

Для начала полезно вспомнить, что происходит при смешивании двух жидких буферов с разными рН. Буферы могут быть любой химической природы; их взаимодействие будет происходить с участием одного общего для любых буферов компонента — находящихся в растворе протонов (рН буфера — это отрицательный логарифм молярной концентрации протонов). Представим себе, например, что к некоторому объему 0,01 М Трис-НСl (рН 9) мы понемногу приливаем 0,01 М Na-ацетатный буфер (рН 4). Исходная концентрация протонов в первом буфере составляла 10^{-9} М. Ей отвечало динамическое равновесие, при котором незначительная часть молекул Трис находилась в растворе в виде ионов Трис⁺, а подавляющее большинство их было незаряжено. Концентрация протонов в исходном Na-ацетатном буфере хотя и невелика, но в 10^5 раз больше (10^{-4} М). При его добавлении происходит как бы титрование Трис-буфера кислотой. Первоначальное равновесие нарушается: теперь большее число молекул Трис приобретает положительный заряд, однако несколько увеличивается и равновесная концентрация протонов в растворе — он понемногу (буферный эффект!) закисляется. Концентрация протонов в растворе $[H^+]$ должна отвечать одновременному равновесию двух процессов: $\text{Трис} + H^+ \rightleftharpoons \text{Трис}^+$ и $\text{CH}_3\text{COOH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + H^+$. Здесь не фигурируют ионы Na⁺, поскольку они не участвуют в сопряжении двух реакций (оно осуществляется через протоны), но, разумеется, концентрация CH_3COO^- , а следовательно, и равновесие второй реакции зависят от первоначального титрования уксусной кислоты щелочью и $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = [H^+] + [\text{Na}^+]$. По мере добавления все новых порций кислого буфера раствор будет закисляться все сильнее; наконец, его рН начнет приближаться к 4. Этому моменту отвечает превращение почти всех молекул Трис в положительные ионы, так как буферная емкость Трис-буфера при таком рН уже практически исчерпывается.

В то же время происходит постепенное защелачивание Na-ацетатного буфера. Вначале, при добавлении первых порций этого буфера, когда молекул незаряженного Трис еще очень много, защелачивание идет до pH, близких к 9. Далее, по мере обеспечения избытка уксусной кислоты и истощения буферной емкости Трис, Na-ацетатный буфер постепенно возвращается к своему кислому значению pH.

Теперь вообразим, что вместо добавления все новых порций Na-ацетатного буфера мы можем обновлять его в одном и том же объеме. — например, если бы все молекулы и ионы Трис были связаны с какой-то нерастворимой матрицей, суспендированной в части объема стаканчика и уравновешенной в водной среде, оттитрованной с помощью HCl до pH 9. Добавив первую порцию кислого буфера, мы бы подождали, пока установится равновесие ($\text{pH} < 9$), слили бы всю жидкость и заменили ее новой порцией кислого буфера. Если емкость иммобилизованного Трис не была исчерпана, то раствор снова будет защелачиваться, хотя и до меньшего значения pH, чем в первый раз, поскольку часть молекул Трис уже присоединила протон и равновесие несколько сдвинулось в кислую сторону. Сольем раствор, снова заменим его свежей порцией Na-ацетатного буфера и т. д. В ходе этих операций мы обнаружим следующее. Первые несколько порций сливаемой жидкости будут представлять собой титрованный щелочью ацетатный буфер, pH которого будет еще близок к 9. Его концентрация окажется сильно сниженной по остаткам уксусной кислоты, так как не только протоны из диссоциировавших молекул кислоты будут связываться с молекулами Трис, но и анионы CH_3COO^- в равном с ними количестве (вместе с исходным Cl^-) должны будут остаться в стаканчике. Вместе с тем концентрация Na^+ сохранится неизменной, т. е. эффект будет таким же, как если бы при приготовлении Na-ацетатного буфера мы к раствору с меньшей концентрацией уксусной кислоты добавили прежнее количество NaOH.

От порции к порции pH сливаемого из стаканчика Na-ацетатного буфера будет постепенно снижаться, а концентрация его увеличиваться, пока, наконец, после длинной серии таких смен буфера мы не обнаружим, что из стаканчика сливается кислый буфер с pH 4, т. е. такой же, какой мы заливаем в стаканчик. Это означает, что емкость Трис исчерпана и он (при pH 4) не может больше присоединять протоны и защелачивать Na-ацетатный буфер.

Теперь представим себе, что приготовлен длинный ряд стаканчиков с иммобилизованным Трис при pH 9 и что жидкость, сливаемая из первого стаканчика, вносится во второй, из второго — в третий и т. д. И все это повторяется для всех стаканчиков с каждой новой порцией кислого буфера, поступающей в первый стаканчик (практически надо начинать с конца этой цепи и двигаться к началу, чтобы обеспечивать место, куда каждый раз сливать жидкость). Первые порции вносимого Na-ацетатного буфера будут, как мы видели, защелачиваться в первом же стаканчике почти до pH 9 и потому не повлияют существенным образом на значение pH во втором, а тем

более — в последующих стаканчиках. Но затем емкость Трис в первом стаканчике начнет исчерпываться, буфер в нем — закисляться, и теперь уже функцию его возьмет на себя Трис во втором стаканчике. Когда из первого будет поступать уже сильно кислый буфер, начнет исчерпываться и емкость Трис во втором стаканчике, а жидкость в нем начнет закисляться. И так последовательно, в одном стаканчике за другим, будет осуществляться постепенное изменение рН в сторону закисления — от рН 9 до рН 4. Чем дальше от начала ряда расположен стаканчик, тем позже (после протекания большого объема жидкости через систему) в нем будет происходить этот сдвиг рН. И так вплоть до последнего стаканчика — «на выходе» всего ряда.

Теперь мысленно составим все стаканчики в столбик и уберем разделяющие их донышки — получится колонка. Фиксированный на матрице Трис в ней образует сплошную неподвижную фазу. Жидкость, порциями или непрерывным током протекающая сверху вниз («от стаканчика к стаканчику»), выполняет функции подвижной фазы.

Первоначально вся подвижная фаза представляет собой водный раствор HCl , которым Трис был дотитрован до рН 9. На верхний конец колонки подается элюент в виде неизменного Na -ацетатного буфера, рН 4. В любом сечении колонки (как в промежуточном стаканчике) в течение некоторого времени элюция будет сохраняться рН 9, а после протекания определенного объема начнется закисление вплоть до рН 4, т. е. реализуется локальный градиент рН. К моменту, когда это произойдет на выходе колонки, через нее может протечь большой объем элюента — во много раз больший, чем объем самой колонки. До этого заключительного момента рН подвижной фазы не будет одинаковым по всей высоте колонки. Он будет совпадать с рН элюирующего (кислого) буфера в верхней части колонки, будет равен рН исходного (щелочного) буфера в ее нижней части, а где-то между ними, постепенно перемещаясь от начала колонки к ее концу, будет находиться переходная область локального градиента рН.

Таким образом, мы уже построили мысленно колонку для хроматофокусирования и описали основную, характерную для нее процесс движения градиента рН. Для ясности мы рассматривали поведение двух привычных буферов. Реально же у такой колонки градиент изменений рН в каждом сечении оказался бы сугубо нелинейным, так как области буферных емкостей Трис и ацетата ограничены и далеко не совпадают друг с другом. Для хорошего фракционирования белков с различными значениями pI градиент рН в каждом сечении колонки должен быть линейным. С этой целью на ионообменнике фиксируют не одну, а, как уже отмечалось, много ионогенных, обладающих буферной способностью групп с широким диапазоном значений pK . Элюирующий буфер также должен быть многокомпонентным, способным сохранять буферную емкость в широком диапазоне рН. Отсюда его название — «полибуфер». Весь диапазон рН 4—9 (который обеспечивает полибуфер-ионообменник РВЕ 94) одним полибуфером перекрыть не удастся, поэтому фирма «Pharmacia» выпускает два типа полибуферов (96 и 74) для соответствующих диапазонов рН.

На рис. 129 приведены кривые титрования полибуферов-ионообменников и просто полибуферов, взятые из рекламного материала фирмы «Pharmacia». Хорошо видно, что эти кривые почти прямолинейны в очень широких интервалах значений рН.

Надо себе ясно представлять, что ни полибуферы-ионообменники, ни полибуферы сами по себе не задают и не фиксируют каких-либо значений рН. Их надо титровать щелочью, кислотой или буферной смесью до нужных исходных значений рН. Далее эти рН будут изменяться в ходе описанных выше взаимодействий — важно то, что

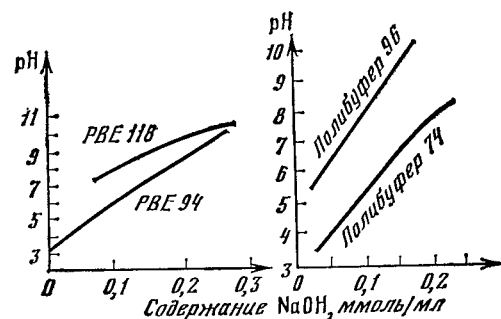


Рис. 129. Кривые титрования полибуферов-ионообменников и полибуферов для хроматофocusing (по данным фирмы «Pharmacia»)

при всех изменениях будет сохраняться высокая буферная емкость системы (поскольку оба ее компонента такой емкостью обладают).

Для работы с ионообменником RBE 118 вместо специального полибуфера рекомендуется использовать амфолиты для ИЭФ, а именно типа «Pharmalyte 8—10,5».

Полибуферы - ионообменники типов RBE 94 и RBE 118 устойчивы при рН 3—12, не боятся контакта с мочевиной; их можно автоклавировать. Жесткость химически сшитой сефарозы допускает

увеличение скорости течения элюента до 120 мл/см²·ч. Объемы обменников не изменяются при изменениях рН и ионной силы раствора (например, при промывке обменника 1 M NaCl).

В новой системе ионообменной хроматографии для умеренных давлений «Pharmacia FPLC System» наряду с описанными выше типами анионо- и катионообменника предусмотрен и полибуфер-анионообменник типа «Моно Р». Его буферные свойства — такие же, как у RBE 94, а высокие физические характеристики (пористость, жесткость, гомогенность размеров сферических гранул) — такие же, как у обменников «Моно Q» и «Моно S».

Оба жидких полибуфера почти прозрачны при длине волны 280 нм, заметно поглощают при 254 нм и очень сильно — в более короткой области УФ-света.

Как уже ясно из предшествующего анализа процесса хроматофocusing, перед загрузкой препарата в колонку и началом хроматографии необходимо произвести следующие две подготовительные операции: выбранный тип полибуфера-ионообменника (RBE 94 или RBE 118) уравновесить исходным буфером до щелочного значения рН, отвечающего верхней границе намеченного для элюции градиента рН, и подходящий тип жидкого полибуфера («Polybuffer 96», «Polybuffer 74» или раствор «Pharmalyte 8—10, 5») оттитровать кислотой до относительно кислого значения рН, отвечающего нижней грани-

це намеченного градиента рН. Теперь рассмотрим, каким образом в такой хроматографической системе происходит фракционирование белков.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Пусть в колонку, заполненную РВЕ и уравновешенную исходным буфером при некотором значении рН, мы вносим смесь белков, различающихся между собой значениями pI . Выберем рН исходного буфера так, чтобы он был выше, чем pI любого из белков смеси. Все белки заряжаются отрицательно и сорбируются на анионообменнике в верхней части колонки. Прочность их сорбции окажется неодинаковой. Очевидно, что наиболее прочно свяжутся с обменником белки с наименьшим значением pI — они будут нести наибольший отрицательный заряд.

Начнем элюцию кислым полибуфером. Через некоторое время в верхней части колонки рН начнет изменяться в сторону закисления. Когда он уменьшится до значения pI наиболее щелочного из белков, этот белок начнет диссоциировать от обменника, вымываться током буфера и перемещаться вместе с ним по колонке. Но здесь он попадет в область, где снижение рН еще не началось или если и началось, то не достигло значения, равного его pI . Белок снова приобретет отрицательный заряд и свяжется с обменником. В ходе дальнейшей элюции рН понизится и в этой области. Рассматриваемый белок снова десорбируется и переместится еще ниже, где опять сорбируется. Так начинается миграция зоны первого из белков вниз по колонке. Скорость миграции будет определяться скоростью распространения изменения рН по высоте колонки. Она будет заведомо меньше, чем скорость элюции, и тем меньше, чем менее концентрированный полибуфер используется для элюции.

Между тем рН в области первоначальной зоны сорбции препарата будет продолжать снижаться. Через некоторое время наступит очередь следующего белка начинать миграцию вниз по колонке. Это будет белок, у которого значение pI меньше, чем у первого, но наибольшее среди всех остальных. За ним в порядке убывания pI из стартовой зоны будут выходить один за другим и все остальные белки. Можно сказать, что в верхней части колонки будет идти элюция белков смеси локальным градиентом рН. Каждая белковая зона будет мигрировать со своей скоростью и тем медленнее, чем меньше значение pI соответствующего белка (тем легче он сорбируется и труднее десорбируется на всех последующих участках своего пути). К моменту выхода из колонки все белки окажутся разделенными и будут элюироваться в порядке убывания своих pI .

Мало того, в ходе элюции будет происходить сужение белковых зон, подобно тому как это происходит при изoeлектрическом фокусировании. Действительно, белки из передней части зоны конечной ширины раньше всего окажутся в области щелочных рН, диктующих замедление их движения и сорбцию на новом участке колонки. В это время белки, мигрирующие из задней части зоны того же бел-

ка, будут еще находиться в более кислой области колонки, а следовательно, будут продолжать движение и нагонять ушедшие вперед тождественные им белки. Этот процесс напоминает обострение границ зон при электрофорезе в градиенте пористости полиакриламидного геля. Сужение зон будет происходить на всем пути миграции белков по колонке. Ему будет противодействовать лишь продольная диффузия, которая в зависимости от загрузки зоны и определит ширину белкового пика на выходе колонки. Отсюда следует, в частности, что объем исходного препарата при хроматофокусировании может быть большим; это не мешает компонентам белковой смеси выходить сфокусированными в узкие, хорошо разделенные зоны (при достаточной длине колонки). Такое явление и оправдывает включение в название метода термина «фокусирование». Сходство с изоэлектрическим фокусированием здесь довольно отдаленное, хотя в обоих процессах решающую роль играют значения pI белков.

Разрешение белковых зон будет тем лучше, чем более пологий градиент pH создается в каждом сечении колонки, иными словами, чем меньше концентрация элюирующего буфера. Однако, как обычно, это «оплачивается» увеличением всего объема элюции, а следовательно, и объемов самих белковых зон. Оптимальные результаты дает элюция, которая завершается при прохождении через колонку элюирующего буфера в количестве 10—15 объемов колонки.

Из проведенного рассмотрения следует, что по мере закисления обменника будет увеличиваться плотность расположения в нем положительно заряженных групп. Это не должно сильно сказываться на характере процесса, поскольку одновременно будет осуществляться блокирование этих групп анионами из полибуфера. Они даже будут в какой-то мере способствовать десорбции белка, вытесняя его из связей с ионами обменника. Однако концентрация полибуфера невелика, а дополнительные ионы соли в полибуфер не вносят, поэтому основной механизм фракционирования связан не с вытеснением, а с перезарядкой белковых молекул за счет градиентного изменения pH .

Выбор РВЕ и полибуфера диктуется диапазоном значений pI фракционируемых белков. Полибуферы обеспечивают диапазоны pH 6—9 и 4—7. Если необходимо работать в области их перекрытия, то можно использовать смесь полибуферов. Так, для диапазона pH 5—8 рекомендуется приготовить смесь, содержащую 30% полибуфера 96 и 70% полибуфера 74. Полибуфер-ионообменник во всех этих случаях один и тот же — РВЕ 94. Для диапазона pH 8—11, естественно, надо воспользоваться РВЕ 118 и «Pharmalyte 8—10,5».

Практика показывает, что условия элюции оказываются наилучшими, когда среднее значение pI для всей смеси белков оказывается на расстоянии $1,3-1\frac{1}{2}$ ширины градиента pH , считая от его щелочного конца. Максимальная ширина градиента, перекрываемого каждым из полибуферов, составляет 3 ед. pH . Можно задать более узкий градиент, выбрав соответственно значения pH , при котором уравнивать обменник и до которого титровать полибуфер. Если pI бел-

ков не известны, приходится условия хроматофокусирования подбирать эмпирическим путем. Начать лучше с градиента рН 7—4. Если окажется, что для интересующих экспериментатора белков $pI > 7$, то они не будут сорбироваться и без задержки выйдут из колонки (если начинать подбор с pI 9—6, то белки с $pI < 6$, наоборот, «застрянут» на колонке).

Щелочная граница градиента pI , как уже говорилось, задается выбором рН исходного буфера, которым уравнивают обменник. Это удобно делать на воронке, пропуская через суспензию полибуфера-ионообменника 10—15 объемов буфера, после чего его можно перенести в хроматографическую колонку.

Для РВЕ 94 фирма «Pharmacia» рекомендует следующий список буферов в зависимости от значения рН щелочной границы градиента ($pH_{щ}$):

$pH_{щ}$	Буфер	Его рН	$pH_{щ}$	Буфер	Его рН
9	Этаноламин-HCl	9,4	6	Гистидин-HCl	6,2
8	Трис-HCl	8,3	5	Пиперазин-HCl	5,5
7	Имидазол-HCl	7,4			

Молярность для всех этих буферов рекомендуется одна и та же — 0,025 М (считая по основанию). Легко заметить, что во всех случаях рекомендуется выбрать несколько более щелочной буфер, чем наметенная граница рабочего диапазона. Это делается для того, чтобы некоторые флюктуации pI в момент внесения препарата оставались за пределами диапазона.

Первые три из указанных буферов можно вместо HCl титровать уксусной кислотой, если ее же используют для титрования полибуфера. Обычно полибуферы до pH нижней границы градиента титруют HCl, но если эта граница для полибуфера 96 оказывается в области рН 5—6, то лучше воспользоваться CH_3COOH — это уменьшит влияние растворенного CO_2 . Вообще CO_2 дестабилизирует градиент рН, и полибуфер перед использованием надо обязательно деаэрировать. Для фракционирования щелочных белков РВЕ 118 рекомендуется уравнишивать 0,025 М триэтиламин-HCl (pH 11), а «Pharmalyte 8—10,5» оттитровать HCl до нижней границы градиента рН и разбавить водой в соотношении 1 : 45.

Молярность полибуфера нельзя охарактеризовать одной цифрой, поскольку он представляет собой сложную смесь веществ. Указывается среднее приращение концентрации, приходящееся на 1 ед. диапазона pI (0,075 М). Разбавление полибуфера определяет объем элюции. Для обеспечения рекомендованного выше соотношения этого объема и объема колонки (12 : 1) фирма предлагает продажный препарат полибуфера разбавлять водой в соотношении 10 : 1. При вытекании примерно первых двух объемов колонки элюент на ее выходе будет сохранять исходное значение рН, хотя состав буфера после выхода свободного объема колонки и начнет меняться. Затем начнет-

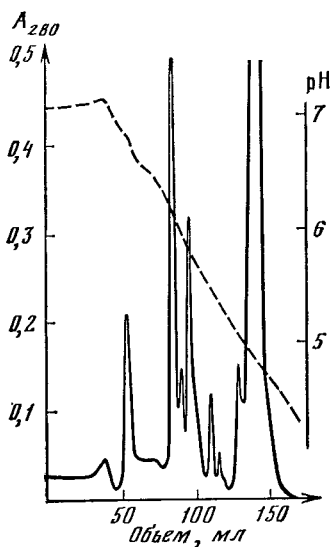
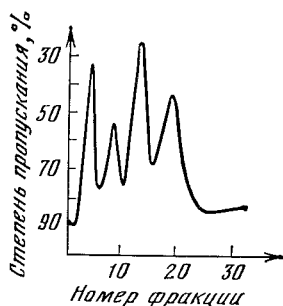


Рис. 130. Фракционирование белков яичного белка хроматофокусированием на колонке РВЕ94 (по данным фирмы «Pharmacia»)

Рис. 131. Разделение субъединиц α -кристаллина хроматофокусированием на колонке РВЕ94 [Bloemendal, Groenewoud, 1981]



ся постепенное, растянутое на 10 объемов колонки снижение — будет реализовываться градиент рН в нижнем сечении колонки.

На рис. 130, заимствованном из рекламной брошюры фирмы «Pharmacia» «Chromatofocusing with Polybuffer and PVE», изменение рН на выходе колонки показано пунктиром. Рисунок иллюстрирует характер фракционирования белков яичного белка. Колонка РВЕ 94 (1 × 30 см) была уравновешена 0,025 М буфером имидазол-НСl (рН 7,2). Элюцию вели полибуфером 74, титрованным НСl до рН 4 и разбавленным, как указано выше. Скорость элюции — 40 мл/см²·ч. Препарат (0,5 мл яичного белка) вносили на колонку после разбавления его полибуфером (1 : 10).

Можно вносить препарат и в исходном буфере колонки. Здесь выбор определяется в первую очередь стабильностью и растворимостью белков препарата. Так поступали, например, на заключительном этапе очистки из клеток HeLa белка, необходимого для репликации полиовируса [Varon, Baltimore, 1982]. Колонку РВЕ 94 уравновешивали 0,025 буфером имидазол-НСl (рН 7,4) и в нем же растворяли препарат. Авторы отмечают, что в отличие от рекомендаций фирмы элюцию с использованием полибуфера 74 (рН 4) следует начинать не сразу, а после промывки колонки с сорбированным на ней белком тремя объемами исходного буфера. Это улучшает линейность градиента рН при элюции.

Иногда, если некоторые белки склонны выпадать в осадок (вблизи рI), концентрацию полибуфера приходится увеличивать или даже вводить в него соль, жертвуя качеством разрешения. Впрочем, не всегда обязательно надо добиваться полного растворения исходного препарата. На заключительном этапе очистки триптофанил-тРНК-синтетазы методом хроматофокусирования оказалось, например, что в исходном буфере колонки (рН 5,2) около половины суммарно-

го белка, в том числе и синтетазы, выпадало в осадок. Тем не менее на колонку РВЕ 94 вносили суспензию этого осадка и начинали элюцию полибуфером (рН 4). Осадок постепенно растворялся, и растворенный фермент выходил из колонки острым пиком, хорошо отделяясь от примесных белков (также растворенных). Выход суммарного белка при этом составлял 90%, а выход ферментативной активности — 80%. В этой же работе было обнаружено, что элюцию пика ферментативной активности можно ускорить и тем улучшить его отделение от выходящих позже примесей, если в разбавленный, как обычно, полибуфер добавить в небольшой концентрации (до 0,035 М) KCl. По-видимому, ионы соли играют здесь свою обычную для ионообменной хроматографии конкурентную роль, способствуя элюции в первую очередь наиболее слабо связанного с обменником белка (в данном случае — как раз очищаемой синтетазы) [Carter, Green, 1982].

Недавно было описано использование хроматофокусирования на заключительном этапе очистки рецептора 1,25-дихолекальциферола из кишечника цыпленка [Simpson, De Luca, 1982]. Блюмендаль и Гроеневуд показали, что хроматофокусирование можно вести в присутствии 6 М мочевины. Им это было необходимо для диссоциации крупных (до $M = 10^6$) агрегатов α -кристаллина. На рис. 131 показано разделение исходного белка на 4 субъединицы. 140 мг очищенного α -кристаллина вносили на колонку РВЕ 94 ($0,9 \times 30$), уравновешенную 0,025 М имидазол-HCl (рН 7,4) с 6 М мочевиной. Полибуфер 74 разбавляли в отношении 1 : 13 водой, добавляли в него до 6 М мочевины и титровали HCl до рН 6,4. Следует обратить внимание на узость использованного градиента рН [Bloemendal, Groenewoud, 1981].

Недавно Энтиан и соавторы описали разделение методом хроматофокусирования трех изоферментов энолазы из дрожжей. Все они являются гидрофобными белками. Для улучшения растворимости и сохранения нативности изоферментов колонку РВЕ 94 уравновешивали 0,025 М раствором этаноламина, титрованного CH_3COOH до рН 9,4, с добавлением до 15% этиленгликоля; элюцию проводили полибуфером 96, рН 6. Изоферменты энолазы выходят из колонки при рН 8,65; 7,6 и 6,65 [Entian et al., 1983].

В работе Гизина и соавторов хроматофокусирование на колонке РВЕ 94 осуществляли путем трехступенчатой элюции: сначала полибуфером РВ 96, титрованным до рН 6,5, затем полибуфером РВ 74 при рН 5 и 3,8. Авторы нашли, что для воспроизводимости градиентов рН и количественного выхода белка полибуферы предпочтительно титровать не CH_3COOH , как рекомендует фирма «Pharmacia», а HCl [Gysin et al., 1983].

В заключение приведем несколько практических рекомендаций фирмы.

Количество РВЕ можно выбирать, ориентируясь на максимальную загрузку — примерно 100 мг белка на 10 мл обменника. Для тонких разделений близких по значениям рI белков ее следует уменьшить, иногда до 1—2 мг белка на 10 мл РВЕ.

Набивку колонки следует производить обычным способом, начиная с приготовления густой суспензии обменника, уравновешенного исходным буфером, и кончая прокачкой того же буфера через колонку со скоростью около 100 мл/см²·ч до окончательного ее уплотнения. Качество набивки можно проконтролировать пропусканием сильнощелочного окрашенного белка, например цитохрома с быка (pI = 10.5).

Объем препарата может быть довольно большим, но не более половины свободного объема колонки. Для обеспечения сорбции препарата в узкой начальной зоне его следует освободить от солей. Скорость элюции должна составлять примерно 30—40 мл/см²·ч. Иногда ее можно удвоить, сохранив приемлемое качество разрешения пиков.

Регистрацию выхода белков можно вести по УФ-поглощению при 280 нм, но не по поглощению пептидной связи (210—230 нм), так как в этой области сам полибуфер сильно поглощает свет. Полибуфер не мешает окраске белка красителями типа СВВ. Для определения концентрации белка во фракциях можно использовать количественные методы, основанные на окрашивании такими красителями. Определение белка по методу Лоури в присутствии полибуфера проводить нельзя, так как он связывает ионы меди.

Оценка pI белка по значениям pH во фракциях дает несколько заниженные результаты. Причина состоит в том, что внутри гранул анионообменника pH несколько выше, чем в окружающем их элюенте, за счет электростатического «выталкивания» протонов из гранул (эффект Доннана).

Освободить белок от полибуфера можно осаждением сульфатом аммония или гель-фильтрацией на сефадексе G-75 (для белков с $M > 25\,000$).

Регенерацию РВЕ можно вести прямо в колонке промывкой ее 1 М NaCl, а если надо, то и кратковременно 0,1 н. HCl. Затем ее следует снова уравновесить исходным буфером.

ЛИТЕРАТУРА

- Asteriadis G. T., Armbruster M. A., Gilham P. T. — Anal. Biochem., 1976, 70, p. 64—74.
 Arelson J. T., Bodley J. W., Walseth T. F. — Anal. Biochem., 1981, 116, p. 357—360.
 Baron M. H., Baltimor D. — J. Biol. Chem., 1982, 257, p. 12351—12358.
 Baumann G., Chrambach A. — Anal. Biochem., 1975, 69, p. 649—651.
 Bloemendal H., Groenewoud G. — Anal. Biochem., 1981, 117, p. 327—329.
 Bubltz C. — Anal. Biochem., 1978, 88, p. 109—113.
 Burnette B., McFarland C. R., Batra P. — J. Chromatogr., 1983, 277, p. 137—144.
 Cabrer B., Taira H., Broeze R. J. et al. — J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 3681—3684.
 Carter C. W., Green D. C. — Anal. Biochem., 1982, 124, p. 327—332.
 Chin C. C. Q., Wolf F. — Meth. Enzymol., 1977, 47, p. 204—210.
 Chooi W. Y. — Biochemistry, 1980, 19, p. 3469—3476.
 Coppin-Raynal E. — Anal. Biochem., 1980, 109, p. 395—398.
 Cudny H., Zaniewski R., Deutscher M. P. — J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 5627—5632.
 D'Anna J. A., Gurley L. R., Becker R. R. — Biochemistry, 1981, 20, p. 4501—4505.
 Degen J., Kyte J. — Anal. Biochem., 1978, 89, p. 529—539.

- Demushkin V. P., Plyashkevich Yu. C.—Anal. Biochem., 1978, 84, p. 12—18.
- Dizgaroglu M., Krutzsch H. C., Simic M. G.—J. Chromatogr., 1982, 237, p. 417—428.
- Dolby T. W., Ajiro K., Borun T. W. et al.—Biochemistry, 1979, 18, p. 1333—1344.
- Entian K.-D., Meurer B., Mecke D.—Anal. Biochem., 1983, 132, p. 225—228.
- Flaschner M., Ramsden H., Crane L. J.—Anal. Biochem., 1983, 135, p. 340—344.
- Gillam I. C., Tener G. M.—Meth. Enzymol., 1971, 20, p. 55—70.
- Gillam I. C., Tener G. M.—Anal. Biochem., 1980, 105, p. 405—406.
- Golomb M., Grandgenett D. P.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 1606—1613.
- Guifoyle T. J.—Biochemistry, 1980, 19, p. 5966—5972.
- Gupta P., Hanash S. M.—Anal. Biochem., 1983, 134, p. 117—121.
- Gupta S., Pfannkoch E., Regnier F. E.—Anal. Biochem., 1983, 128, p. 196—201.
- Gysin R., Yost B., Flanagan S. D.—Biochemistry, 1983, 22, p. 5781—5789.
- Haddox M. K., Russel D. H.—Biochemistry, 1981, 20, p. 6721—6729.
- Heiland I., Wittmann-Liebold B.—Biochemistry, 1979, 18, p. 4605—4612.
- Herman A. C., Vanaman T. C.—Meth. Enzymol., 1977, 47, p. 220—236.
- Huang I.-Y., Ewing C., Yoshida A.—Anal. Biochem., 1976, 73, p. 301—307.
- Ikeda Y., Steiner M.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 66—74.
- Isackson P. J., Debold W. A., Reeck G. R.—FEBS Lett., 1980, 119, p. 337—342.
- Kaempfer R., Hollender R., Soreq H., Nudel U.—Europ. J. Biochem., 1979, 94, p. 591—600.
- Kastern W. H., Eldridge J. D., Mullinix K. P.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 7368—7376.
- Kato Y., Komiya K., Hashimoto T.—J. Chromatogr., 1982a, 246, p. 13—22.
- Kato Y., Nakamura K., Hashimoto T.—J. Chromatogr., 1982b, 245, p. 193—211.
- Kato Y., Nakamura K., Hashimoto T.—J. Chromatogr., 1982c, 253, p. 219—225.
- Kato Y., Sasaki M., Hashimoto T.—J. Chromatogr., 1983, 265, p. 342—346.
- Kopaciewicz W., Regnier F. E.—Anal. Biochem., 1983, 133, p. 251—259.
- Lawson T. G., Regnier F. E., Weith H. L.—Anal. Biochem., 1983, 133, p. 85—93.
- Lay C. Y.—Meth. Enzymol., 1977, 47, p. 236—243.
- Libertini L. J., Smoll E. W.—Nucl. Acids Res., 1980, 8, p. 3517—3534.
- Lindblom H., Axio-Fredriksson U.-B., Cooper E. H., Turner R.—J. Chromatogr., 1983, 273, p. 107—116.
- Mahoney W. C., Hermodson M. A.—Biochemistry, 1979, 18, p. 3810—3814.
- Marekov L. N., Beltchev B.—Anal. Biochem., 1981, 115, p. 93—96.
- McLaughlin L. W., Romaniuk E.—Anal. Biochem., 1982, 124, p. 37—44.
- McLaughlin L. W., Cramer F., Sprinzl M.—Biochemistry, 1981, 112, p. 60—69.
- Miura K., Hayashi Y.—Meth. Enzymol., 1967, 12, p. 390—395.
- Moran R. G., Werkheiser W. C.—Anal. Biochem., 1978, 88, p. 668—674.
- Myers J. C., Ramirez F., Kacian D. L. et al.—Anal. Biochem., 1980, 101, p. 88—96.
- Newton C. R., Greene A. R., Heathcliffe G. R. et al.—Anal. Biochem., 1983, 129, p. 22—30.
- Nishimura S., Weinstein I. B.—Biochemistry, 1969, 8, p. 832—842.
- Nissinen E.—Anal. Biochem., 1980, 106, p. 497—505.
- Osterman L.—Anal. Biochem., 1971, 43, p. 254—258.
- Peterson E. A., Kuff E. L.—Biochemistry, 1969, 8, p. 2916—2923.
- Regnier F. E.—Anal. Biochem., 1982a, 126, p. 1—7.
- Regnier F. E.—Anal. Biochem., 1982b, 128, p. 196—201.
- Rhodes G., Jentsch K. D., Jovin T. M.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 7465—7467.
- Robinson E. A., Apella E.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 11415—11430.
- Roe B. A., Stankiewicz A. F., Rizi H. L. et al.—Nucl. Acids Res., 1979, 6, p. 673—688.
- Rubin R. A., Modrich P.—Meth. Enzymol., 1980, 65, p. 96—104.
- Salas C. E., Dirheimer G.—Nucl. Acids Res., 1979, 6, p. 1123—1133.

- Sampaio M. U., Reis M. L., Fink E.* et al.—*Anal. Biochem.*, 1977, 81, p. 369—383.
- Simpson R. U., DeLuca H. F.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1982, 79, p. 16—20.
- Smith A. J., Billett M. A.*—*Biochim. et biophys. acta*, 1982, 697, p. 121—133.
- Smith B. J., Johns E. W.*—*FEBS Lett.*, 1980, 110, p. 25—29.
- Spadaro A. C. C., Draghetta W., DelLama S. N.* et al.—*Anal. Biochem.*, 1979, 96, p. 317—321.
- Stringer E. A., Chaudhuri A., Valenzula D., Maitra U.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1980, 77, p. 3356—3359.
- Stunnenberg H. G., Wennekes L. M. J., Spierings T., van der Broek H. W. J.*—*Europ. J. Biochem.*, 1981, 117, p. 121—129.
- Suelter C. H., DeLuca M.*—*Anal. Biochem.*, 1983, 135, p. 112—119.
- Takahashi N., Isobe T., Kasai H.* et al.—*Anal. Biochem.*, 1981, 115, p. 181—187.
- Tener G. M.*—*Meth. Enzymol.*, 1967, 12, p. 398—404.
- Ting Shih C.-Y., Toivonen J. E., Craven G. R.*—*Europ. J. Biochem.*, 1979, 97, p. 189—196.
- Tomlinson R. V., Tener G. M.*—*Biochemistry*, 1963, 2, p. 697—702.
- Torres A. R., Peterson E. A.*—*Anal. Biochem.*, 1979, 98, p. 353—357.
- Torres A. R., Kuehl L., Peterson E. A.*—*Biochim. et biophys. acta*, 1982, 698, p. 303—306.
- Vaistius A. C., Horgen P. A.*—*Biochemistry*, 1979, 18, p. 795—803.
- Vandenbergh A., Nelles L., De-Wachter R.*—*Anal. Biochem.*, 1980, 107, p. 369—376.
- Vandenheede J. R., Yang S.-D., Merlevede W.*—*J. Biol. Chem.*, 1981, 256, p. 5884—5890.
- Vanecek G., Regnier F. E.*—*Anal. Biochem.*, 1980, 109, p. 345—353.
- Vanecek G., Regnier F. E.*—*Anal. Biochem.*, 1982, 121, p. 156—169.
- Van Helden P. D., Strickland W. N., Brandt W. F., von Holt C.*—*Europ. J. Biochem.*, 1979, 93, p. 71—78.
- Vogt V. M.*—*Meth. Enzymol.*, 1980, 65, p. 248—255.
- Wieringa B., Roskam W., Arnberg A.* et al.—*Nucl. Acids Res.*, 1979, 7, p. 2147—2163.
- Williams K. R., Lo Presti M. B., Setoguchi M., Konigsberg W. H.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1980, 77, p. 4614—4617.
- Yuki H., Yajima T., Kawasaki H., Yamaji A.*—*Anal. Biochem.*, 1979, 97, p. 203—209.
- Zimmer S. G., Millette R. L.*—*J. Biol. Chem.*, 1979, 254, p. 2199—2204.

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ВВЕДЕНИЕ

По своему существу аффинная хроматография — это особый тип адсорбционной хроматографии. В отличие от того, что было описано в гл. 6, адсорбция здесь осуществляется за счет биоспецифического взаимодействия между молекулами, закрепленными на матрице, т. е. связанными в неподвижной фазе, и комплементарными к ним молекулами, подлежащими очистке или фракционированию, поступающими, а затем элюируемыми с подвижной фазой. Биоспецифическое взаимодействие отличается исключительной избирательностью, а зачастую и очень высокой степенью сродства между партнерами. Оно лежит в основе множества строго детерминированных процессов, протекающих в организме. В качестве примеров можно назвать взаимодействия между ферментами и их субстратами, кофакторами или ингибиторами, между гормонами и их рецепторами, между антигенами и специфическими для них антителами, между нуклеиновыми кислотами и специфическими белками, связывающимися с ними в процессе осуществления своих функций (полимеразами, нуклеазами, гистонами, регуляторными белками), а также между самими нуклеиновыми кислотами-матрицами и продуктами их транскрипции. Наконец, многие малые молекулы (витамины, жирные кислоты и др.) специфически связываются со специальными транспортными белками.

Любой из компонентов названных и им подобных биоспецифических пар можно надежно закрепить на матрице в качестве так называемого «лиганда». С его помощью второй партнер пары может быть извлечен из смеси с другими, не комплементарными лиганду веществами и временно задержан на матрице в составе биоспецифического (аффинного) комплекса. Иногда это может быть не одно, а несколько родственных или схожих по своей структуре веществ, «узнающих» один и тот же лиганд, например изоферменты или ряд ферментов, использующих один и тот же кофермент, различные виды антител к одному и тому же антигену и т. д.

После удаления посторонних примесей промывкой состав элюента можно изменить таким образом, чтобы ослабить силу всех биоспецифических взаимодействий. Равновесия адсорбции, первоначально очень сильно сдвинутые в сторону образования комплексов, могут измениться таким образом, что фракционируемые вещества начинают мигрировать по колонке с различной скоростью, что характерно для процесса динамической хроматографии. Однако этот вариант (аффинное хроматографическое фракционирование родственных веществ) на практике встречается значительно реже, чем статический

вариант аффинной очистки одного вещества, избирательно сорби-рованного на матрице с закрепленным на ней специфическим лигандом. В этом случае с помощью элюента нарушают биоспецифическую связь лиганда с веществом, что позволяет быстро вывести последнее из колонки или легко отмыть его с матрицы на фильтре, если аффинную очистку ведут в свободном объеме.

Аффинную связь вещества с сорбентом можно нарушить либо непосредственно, путем создания неблагоприятных для биоспецифического взаимодействия условий, либо путем конкурентной аффинной элюции. Биоспецифическое взаимодействие реализуется в конце концов за счет тех же, хорошо знакомых сил связи между молекулами, которые фигурировали при рассмотрении других видов хроматографии: электростатического притяжения разноименно заряженных групп, водородных и ван-дер-ваальсовых сил, гидрофобного взаимодействия. Биоспецифичность определяется конформационным соответствием участков связывания, что приводит к суммированию различных взаимодействий, осуществляющихся одновременно в нескольких точках. Ослабление биоспецифических сил связи может быть достигнуто обычными приемами: изменением pH, увеличением ионной силы и температуры элюента, введением в его состав органических растворителей, детергентов или хаотропных агентов. К такому же эффекту могут приводить воздействия денатурирующих веществ, нарушающих само конформационное соответствие (мочевины, гуанидинхлорида и др.).

Высокая степень аффинного сродства в некоторых случаях может быть нарушена только путем использования столь жестких воздействий, что они могут привести к необратимой денатурации очищаемого вещества. Это обстоятельство всегда следует иметь в виду.

Его можно обойти, используя конкурентный вариант элюции. В этом случае в состав элюента вводят растворенный лиганд, тоже обладающий биоспецифическим сродством к элюируемому веществу (аффинная элюция). Им может быть точно такой же лиганд, какой иммобилизован на матрице, или другой, например ингибитор фермента, в то время как с матрицей связан его кофактор или субстрат. Благодаря специфической конкуренции очищаемое вещество может постепенно сниматься с матрицы и элюироваться в виде комплекса с аффинным элюентом. Во многих случаях такой результат вполне устраивает исследователя. Если же необходимо получить очищенное вещество, то задачу разрушения аффинного комплекса приходится решать уже в растворе, элюированном с сорбента. Иногда ее решить легче, если, например, в качестве элюента использовался лиганд с меньшей степенью сродства к веществу, что может не помешать ему успешно осуществить элюцию, если концентрация этого лиганда в элюенте во много раз превышает эффективную концентрацию лиганда, иммобилизованного на матрице.

Из сказанного ясно, что главное преимущество аффинной хроматографии состоит в ее потенциально очень высокой избирательности, позволяющей извлекать из смесей биологических веществ компоненты, представленные в ничтожно малых относительных количествах,

т. е. в возможности достигать в одной операции колоссальной (иной раз в несколько тысяч раз) очистки искомого биологически активного вещества. Вместе с тем сам способ связывания вещества с матрицей (через лиганд), несмотря на прочность этой связи, является в отличие от других видов хроматографии идеальным мягким и не угрожает нативности, например ферментативной активности белка. Некоторые трудности, правда, могут возникнуть при отработке метода достаточно мягкой элюции, но их обычно удается обойти не только путем использования аффинного элюента, но и посредством управления силой исходного биоспецифического взаимодействия, например путем замены в качестве иммобилизованного лиганда субстрата ферментативной реакции на его аналог.

Немаловажным преимуществом аффинной хроматографии является и то обстоятельство, что в ней гидролитические ферменты (протеазы, нуклеазы и др.) с самого начала отделяются от своих субстратов. В частности, этим обстоятельством обусловлен высокий выход очищаемых макромолекулярных препаратов, характерный для аффинной хроматографии.

Отметим также, что аффинную хроматографию ввиду избирательности сорбции и очень высокого значения коэффициента распределения сорбируемого вещества (в пользу матрицы) отличает возможность использовать большие объемы исходных препаратов и в ходе ступенчатой элюции осуществлять их весьма эффективное концентрирование.

Есть еще одна особенность аффинной хроматографии, которую следует отметить с самого начала. Способ связывания биологически активного лиганда с матрицей обязан не только обеспечивать сохранение его активности, но и не создавать стерических препятствий для взаимодействия сорбируемого вещества с лигандом. Когда в качестве лиганда выступает биополимер (белковый антиген или субстрат, нуклеиновая кислота) и его участок биоспецифического взаимодействия оказывается достаточно удаленным от точки закрепления на матрице, то эта проблема не возникает.

Однако если в качестве лиганда используется низкомолекулярный субстрат, кофактор или гормон, то близость его расположения к гидрофильной матрице (с учетом иммобилизованного на ней слоя молекул воды) может создавать стерические препятствия для правильной ориентации взаимодействующего с лигандом белка. В результате степень аффинного сродства вещества к обменнику снижается, а иной раз падает до нуля. В таких случаях необходимо биологически активный лиганд удалить от матрицы, введя между ними тонкую «ножку», например линейную цепочку из нескольких метиленовых остатков или иную подходящую структуру так называемого «спейсера» большей или меньшей длины.

Хотя принцип аффинной хроматографии очень прост и нагляден, из приведенных кратких замечаний легко понять, что конструирование аффинного обменника для очистки (или фракционирования) нужного вещества является делом достаточно деликатным. Необходимо разумно выбрать матрицу, найти способ щадящего и вместе

с тем надежным и вполне определенным (как правило, химического, т. е. ковалентного) закрепления на ней соответствующего данной задаче лиганда и если необходимо, то не непосредственно, а через спейсер, который также надо выбрать наилучшим образом как в отношении его размеров, степени гидрофильности и т. д., так и в отношении способов его связывания с матрицей и лигандом.

Разумеется, для многих частных, а иногда и довольно общих случаев эта задача решена или облегчена усилиями фирм, выпускающих аффинные сорбенты. Номенклатура их непрерывно расширяется, и некоторые справочные данные о продажных обменниках приведены ниже. Тем не менее каждый исследователь, понимающий исключительные возможности аффинной хроматографии, должен быть готов к тому, чтобы сконструировать, хотя бы с помощью простейших из доступных способов, аффинный обменник для решения своей особой задачи.

Поэтому мы начнем изложение с краткой характеристики используемых в настоящее время компонентов аффинных сорбентов: матриц, лигандов и спейсеров. Одновременно рассмотрим способы соединения их между собой, ограничившись только теми немногими из большого числа вариантов, испробованных и описанных в прошлом десятилетии, которые выдержали проверку временем. Впрочем, к ним имеет смысл добавить два-три только что предложенных способа, обещающих какие-то новые преимущества. Затем можно будет проанализировать более подробно параметры и характерные особенности процесса аффинной хроматографии и на основании этого анализа сформулировать некоторые рекомендации по практической постановке эксперимента.

В заключение рассмотрим достаточное количество более или менее типичных примеров использования разных вариантов аффинной хроматографии, отобранных из периодической научной литературы трех последних лет.

КОМПОНЕНТЫ АФФИННОГО СОРБЕНТА

МАТРИЦЫ

К матрице аффинного сорбента, помимо общих для всех хроматографических матриц требований (нерастворимость и гидрофильность, жесткость, подходящая форма и размер гранул, химическая стабильность в условиях модификации и в самом хроматографическом процессе, отсутствие неспецифической адсорбции и др.), предъявляется требование наличия химических групп, позволяющих с помощью несложной химической реакции ковалентно связывать с матрицей разнообразные биологические молекулы (лиганды и спейсеры). Наиболее удобным с этой точки зрения оказались гидроксильные группы полисахаридных матриц — агарозы и сефадексов, а также амидные группировки полиакриламидного геля. Если иметь в виду аффинную хроматографию белков или использование белко-

вых лигандов, то к названным выше требованиям следует добавить крупнопористый характер матрицы, что удастся сочетать с жесткостью только для агарозы (сефарозы) и смешанных гелей типа «Ultrogel AcA» фирмы «LKB», в которых крупнопористый 2—4%-ный ПААГ укреплен сеткой агарозы. Целлюлоза уступает агарозе в качестве матрицы для аффинной хроматографии из-за собственного ей более высокого уровня неспецифической адсорбции, однако в ряде случаев (особенно для иммобилизации нуклеиновых кислот) она находит себе применение и в аффинных сорбентах. Химически спитый, жесткий декстран типа «Sephacryl» (см. гл. 4) в качестве матрицы для аффинных сорбентов пока что не использовался.

Особенно популярен в качестве аффинной матрицы 4%-ный гель агарозы типа «Sephарозе 4В» (фирма «Pharmacia»). Сферические гранулы этой матрицы размером 60—140 мкм имеют поры, доступные для макромолекул с молекулярной массой порядка нескольких миллионов Дальтон. Матрица стабильна в диапазоне pH 4—9, но детергенты и гуанидинхлорид ее постепенно разрушают. В тех случаях, когда эти ограничения неприемлемы, используют химически спитые матрицы типов «Sephарозе CL-4В» и «Sephарозе CL-6В». Они устойчивы в диапазоне pH 3—14, выдерживают контакт с сильными денатурирующими агентами и органическими растворителями. Однако следует иметь в виду, что около половины гидроксильных групп занято сшивкой, поэтому емкость аффинных сорбентов на основе спитой сефарозы соответственно ниже. Впрочем, как мы увидим дальше, такое снижение емкости не всегда оказывается недостатком.

Фирма «Bio-Rad» выпускает готовые аффинные сорбенты (типа «Affi-Gel») на основе как обычной, так и химически спитой агарозы. В подавляющем большинстве готовых аффинных сорбентов фирм «PL-biochemicals», «Sigma» и «Pierce» (кроме «Agarose-Blue») используется несшитый 4%-ный гель агарозы. Фирмы «LKB» (Швеция) и «IBF» (Франция) также используют в качестве матриц обычную и химически спитую агарозу под названиями «Ultrogel A» и «Ultrogel AR» соответственно. Они (особенно «IBF») широко используют смешанные матрицы типов «Ultrogel AcA 22» и «Ultrogel AcA 34» с посадкой лигандов по амидным группам акриламида. Напомним, что первая цифра в этих наименованиях означает процентное содержание акриламида, а вторая — агарозы. Любопытная новинка обеих фирм — выпуск аффинных сорбентов, обладающих, помимо прочего, еще и способностью намагничиваться. Эту способность привносит включенная в состав геля примесь (до 7%) Fe_3O_4 . Такие гели вместо центрифугирования можно извлекать из суспензии с помощью магнита. Им присвоено торговое наименование «Magnogel». Фирма «LKB» выпускает эти сорбенты на основе смешанной матрицы «Magnogel AcA 44». Фирма «IBF», кроме того, использует магнитную матрицу на основе 4%-ной агарозы «Magnogel A4R». Описано получение аффинных сорбентов на основе недавно появившихся в продаже матриц «Toyopearl» фирмы «Toyo Soda». Образующий эти матрицы гидрофильный полимер (на основе поливинила) обладает большей жесткостью, чем агароза, устойчив к действию высокой температуры

и органических растворителей, не атакуется микроорганизмами [Matsumoto et al., 1982].

В литературе неоднократно описывались попытки использовать в качестве матрицы для аффинных сорбентов пористое стекло [Weetall, Filbert, 1974; Weetall, 1976], однако они не имели успеха ввиду высокой неспецифической адсорбции на стекле. Недавно было предложено использовать для той же цели крупнопористый силикагель. Его модифицировали по силанольным группам γ -аминопропилтриметоксисилоном, к аминогруппам которого с помощью глутарового альдегида присоединяли химотрипсин и сывороточный альбумин [Roy, Kundu, 1979]. Отмеченный в предыдущих главах низкий уровень неспецифической сорбции на силикагеле наряду с его идеальной жесткостью, хорошо разработанной технологией приготовления мелкозернистых и крупнопористых гранул открывает, по-видимому, интересные перспективы для аффинной хроматографии.

Недавно фирма «Seriva» начала производить сорбенты для аффинной хроматографии на основе сферических гранул силикагеля (размеры пор — около 500 Å) с химически закрепленными на их поверхности активными группами, по которым может идти посадка лигандов, следующих типов: «Isocyanate-SP 500», «Epoxypropyl-SP 500», «Glutaraldehyde-SP 500», «Diazoniumphenyl-SP 500», «Hydroxysuccinimidyl-SP 500», «Dihydroxyboryl-SP 500», «Mercaptopropyl-SP 500», «Pyridyldithiopropyl-SP 500», «Acriflavine-SP 500», «Cibacron blue F3GA-SP 500», «Procion Red HE-3B-SP 500» и «Biotinyl-SP 500». Эти новые сорбенты еще недостаточно апробированы, и в литературе пока нет данных об их использовании. Поэтому ограничимся их перечислением — назначение указанных в названиях сорбентов модификаторов нетрудно понять из сопоставления с изложенным ниже материалом, относящимся к активации матриц и использованию некоторых лигандов.

По-видимому, хорошими матрицами для аффинных сорбентов могут служить гидрофильные оксипропилметакрилатные гели, выпускаемые в США и Чехословакии под названием «сфероны». Их гидроксильные группы по своим свойствам аналогичны гидроксилам агарозы. По ним может идти активация бромцаном, присоединение лигандов и спейсеров. Сами матрицы достаточно жестки, химически стойки, не атакуются микроорганизмами. Сфероны выпускаются в виде сферических гранул с широким диапазоном размеров пор [Turkova, 1978].

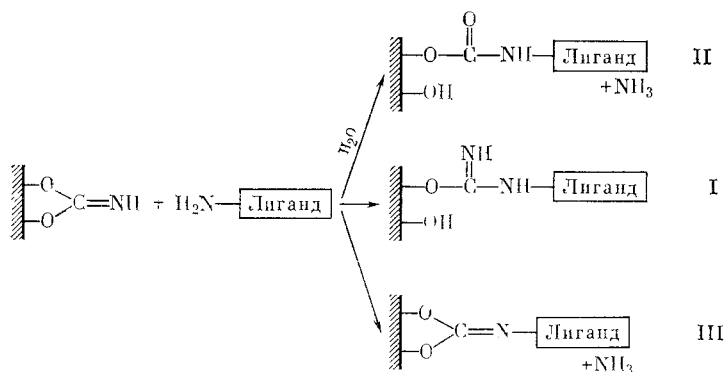
Недавно было описано и запатентовано приготовление сферических гранул полиакролена размером 50—150 мкм. Полимеризацию акролена вели под воздействием облучения радиоактивным кобальтом. Сверху гранулы покрывали тонким слоем агарозы. Лиганды, несущие аминогруппу, или белки, диффундируя через агарозу, связываются с альдегидными группами полиакролена при комнатной температуре и физиологических значениях pH через шиффовы основания. Полиакроленовая матрица способна связать до 10 мг БСА на 1 мл объема [Margel, 1982]. Позже был предложен новый тип матрицы для приготовления иммуносорбентов. Глутаровый альдегид

полимеризовали из водного раствора в присутствии поверхностно активного вещества при pH 11 с образованием микросфер диаметром около 0,2 мкм, которые затем заплavляли в гранулы 4%-ной агарозы диаметром 50–150 мкм. Антигены можно фиксировать на полиальдегиде непосредственно или через спейсеры. Фиксация и в этом случае идет через шиффовы основания при физиологических значениях pH. Агароза обеспечивает жесткость и пористость сорбента [Margel, Offarim, 1983].

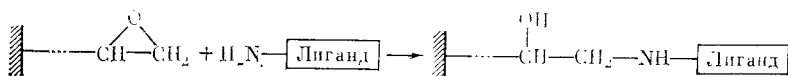
АКТИВАЦИЯ МАТРИЦ

Нередко лиганды представляют собой лабильные биополимеры. Во избежание их денатурации в процессе посадки на матрицу и для упрощения самого этого процесса имеет смысл предварительно активировать матрицу так, чтобы связывание лиганда не требовало ничего, кроме инкубации его раствора с матрицей в относительно мягких условиях. Обычно активирование — это проведение химической реакции с участием некоего активатора, в результате которой на поверхности матрицы образуются весьма реактивные электрофильные группы, охотно образующие ковалентные связи с нуклеофильными группами лиганда, например с его аминогруппами. Приведем несколько примеров таких реактивных групп и реакций присоединения к ним лигандов.

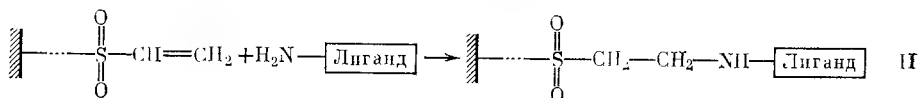
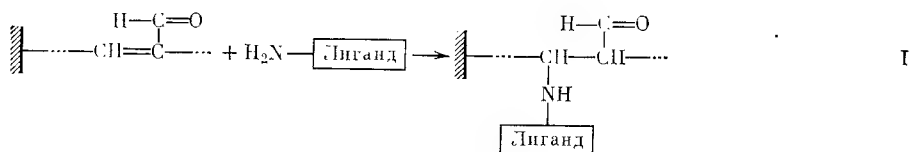
1. В реакции с *имидокарбонатом* лиганд может связаться с матрицей через остаток изомочевины (I), N-замещенный карбамат (II) или N-замещенный имидокарбонат (III):



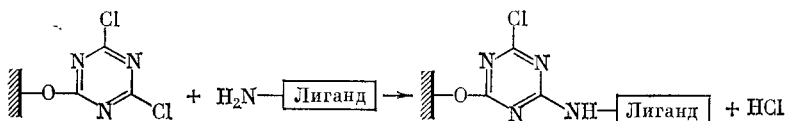
2. Присоединение лиганда к *оксирану* (эпоксидная активация):



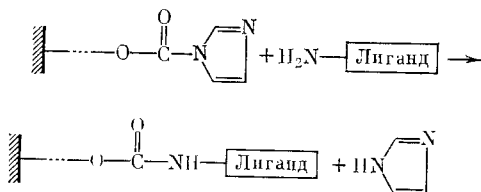
3. Присоединение лиганда по двойной связи, активированной соседством альдегидной (I) или сульфоновой (II) групп:



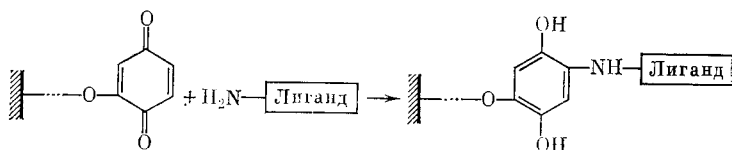
4. Реакция с остатком трихлортриазина:



5. Посадка лиганда на матрицу, активированную имидазолил-карбонатом:

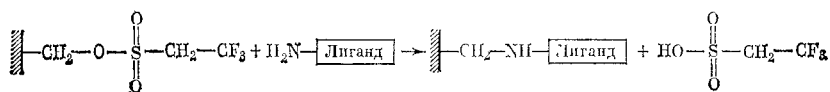


6. Присоединение лиганда к остатку бензохинона:



Во всех приведенных примерах реактивная группа активированной матрицы реагирует с нуклеофильным атомом азота в непротонированной аминогруппе. Для успешного протекания эти реакции приходится вести в более или менее щелочной среде. Недавно был предложен новый вариант активации матриц, несущих OH-группы (агароза, целлюлоза и др.), при котором образуется очень реактивная, так называемая «трезилатная» группировка (см. ниже). Присоединение лиганда идет с замещением всей этой группы в очень мягких

условиях, при нейтральных значениях pH [Nilsson, Mosbach, 1981]:



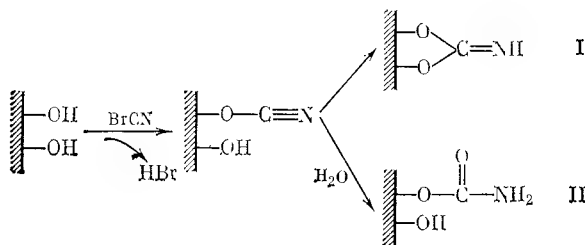
Вместо аминогруппы во всех рассмотренных реакциях могут участвовать другие нуклеофильные группы лиганда, например SH-группы или OH-группа тирозина с образованием связей по сере или кислороду. В нуклеофильной атаке на электрофильные группы активированной матрицы SH-группа наиболее активна, затем следуют NH₂ и фенольная OH-группа. С другой стороны, тиоэфиры заметно менее прочны, чем кислородные эфиры, а последние уступают по прочности связям через аминогруппу. Ввиду этого и с учетом экспонированности на поверхности гидрофильных белков связь белковых лигандов с матрицей осуществляется в порядке убывания вероятности по следующим остаткам аминокислот: Lys—Cys—Tyr—His—(Asp, Glu)—Arg—Trp—(Ser, Thr)—Met [Srere, Uyeda, 1976].

В некоторых случаях, когда присоединение к матрице может затронуть активный центр фермента, его стараются защитить добавлением в реакционную смесь субстрата или конкурентного ингибитора ферментативной активности.

В рассмотренных реакциях фигурировали уже активированные матрицы. Теперь познакомимся со способами их получения, т. е. с реакциями активации сначала полисахаридных матриц, а затем и акриламида. Хотя в продаже имеется целый ряд уже активированных матриц (которые мы назовем ниже), получение их в лабораторных условиях иногда оказывается оправданным свободой выбора степени активации, что, как мы увидим, может играть немалую роль в оптимизации условий аффинной хроматографии.

Активация сефарозы бромцианом

Взаимодействие BrCN в водной среде с двумя соседними гидроксильными матрицы через неустойчивый промежуточный цианат приводит к образованию активного имидокарбоната (I), а также неактивного карбамата (II):



Реакция активации идет только в сильно щелочной среде (pH 10,5—11), которая непрерывно закисляется освобождающейся HBr,

что требует периодического добавления щелочи в ходе реакции или использования достаточно емкого щелочного буфера (например, 1 М Na_2CO_3). Реакция экзотермична — во избежание разогрева в реакционную смесь приходится добавлять лед, поддерживая ее температуру вблизи комнатной.

Здесь необходимо сделать одно существенное замечание. Дело в том, что в таком виде, как она использовалась до сих пор, реакция активации агарозы с помощью BrCN крайне неэкономична. Сильно щелочная среда здесь используется для увеличения нуклеофильности агарозы: без катализатора OH -группа не реагирует с BrCN . Зашелачивание необходимо для частичной ионизации OH -группы ($\text{p}K_a \approx 12$). Но в сильнощелочной среде неустойчивы как сам BrCN , который приходится брать в огромном избытке, так и его эфиры на агарозе, которые быстро гидролизуются с образованием инертных карбаматов, не участвующих в связывании лигандов. Более 80% первоначально образовавшихся активных эфиров цианата в приведенной выше схеме трансформируются именно по этому пути (II).

Кон и Вильчек предложили другую схему реакции активирования, суть которой состоит в увеличении электрофильности циановой группировки за счет ее промежуточного переноса на триэтиламин. Образующийся комплекс успешно атакует неионизованные OH -группы агарозы в нейтральной среде с образованием тех же самых эфиров цианата (ниже эта реакция рассмотрена подробно). Возникает вопрос: имеет ли смысл теперь подробно останавливаться на традиционном методе активации сефарозы? Нам кажется, что имеет. Во-первых, в продаже имеется и еще какое-то время будет находиться именно таким образом активированная сефароза — с ней выполнено огромное число опубликованных работ, на которые приходится ориентироваться, а иногда и воспроизводить. Во-вторых, новый метод только что предложен и еще не прошел надлежащую апробацию.

Итак, вернемся к описанию метода активации сефарозы бромидом в сильнощелочной среде. Заметим, что в ходе образования имидокарбоната могут связываться и OH -группы, принадлежащие соседним нитям в пучках линейных полимеров агарозы (см. гл. 2). Это приводит к уменьшению степени ее набухания и увеличению устойчивости к повышенной температуре и экстремальным значениям pH .

В большинстве опубликованных до сих пор прописей BrCN рекомендуют добавлять в сухом виде. Однако бромидан ограниченно растворяется в воде (до 20 мг/мл), и его кристаллы приходится предварительно растирать. Это крайне неудобно и опасно ввиду очень высокой токсичности BrCN . Кроме того, старые препараты (желто-оранжевого цвета) склонны взрываться. По этой причине следует отдать предпочтение варианту добавления BrCN в виде раствора в хорошо смешивающемся с водой органическом растворителе, например ацетонитриле.

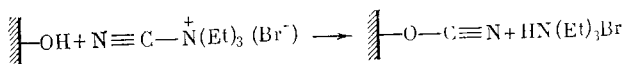
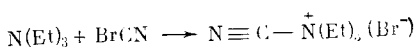
100 мл набухшей сефарозы промывают на бюхнеровской воронке 3—4 объемами деионизованной воды и суспендируют с умеренным перемешиванием в 100 мл воды. Во избежание разрушения гранул

сефарозы можно воспользоваться механической мешалкой с медленно вращающимися лопастями, но не магнитной. В стакан погружают электроды рН-метра и термометр. С помощью 4 н. NaOH титруют суспензию до рН 10,5—11 и добавляют 10 мл концентрированного (1 г/мл) раствора BrCN в ацетонитриле. Эту и все последующие операции следует проводить под надежной тягой ввиду выделения ядовитых паров.

Таким образом, здесь рекомендуется следующее соотношение: 100 мг BrCN на 1 мл набухшей агарозы. Иногда его увеличивают в два и даже три раза в пользу BrCN для получения более высокой плотности расположения (концентрации) активных групп на матрице. Забегая вперед, заметим, что это далеко не всегда выгодно.

Перемешивание продолжают в течение 8—10 мин, подтитровывая по мере необходимости той же щелочью и охлаждая добавлением льда. Об окончании реакции можно судить по прекращению закисления. Активированный гель нестойк при сильнощелочных значениях рН, поэтому его следует немедленно перенести на воронку и промыть сначала 100 мл холодной воды, потом 20 мл ацетона, содержащего 5% воды, а затем обильно (0,3—1 л) 0,1 М Na-бикарбонатным буфером, рН 9,5. Если такую активацию сефарозы проводят в лаборатории, то за ней сразу же следует посадка лиганда, для чего промытую BrCN-активированную сефарозу переносят в колбу с соответствующим буфером. Точно так же можно вести активацию других полисахаридных матриц. Промывные воды после активации сефарозы весьма токсичны, поэтому их нельзя вынимать из под тяги в течение нескольких часов до полного выхода газообразных продуктов. Обезвредить промывные воды можно добавлением в щелочной среде избытка сернистого железа (образуется нетоксичный феррицианид).

Теперь рассмотрим подробнее рекомендации Кона и Вильчека. Суть их метода мы уже изложили. Реакция активации с участием триэтиламина (ТЭА), по мнению авторов, идет через образование при рН 7—8 очень реакционноспособного комплекса триэтиламонийнитрила:



В почти нейтральной среде этот более электрофильный, чем BrCN, комплекс успешно атакует OH-группы агарозы.

Процедура активации состоит в следующем: 10 г влажной сефарозы 4В слегка обсушивают на фильтре и промывают сначала 30%-ным, а затем 60%-ным водным раствором ацетона, суспендируют в 10 мл последнего и охлаждают до -15° . В зависимости от желаемой степени активации (см. ниже) вносят определенный объем 1 М раствора BrCN в ацетоне. При охлаждении и интенсивном перемешивании

добавляют такой же объем 1,5 М раствора ТЭА в 60 %-ном ацетоне (молярное соотношение ТЭА/BrCN — 1,5 : 1). Быстро выливают всю смесь в 100 мл ледяной смеси ацетона и 0,1 н. HCl (1 : 1). В этой среде сорбент может находиться до 1 ч без снижения активности.

Для незамедлительной посадки лиганда сорбент промывают 60 %-ным ацетоном, затем быстро — 30 %-ным, холодной водой и буфером для реакции присоединения лиганда.

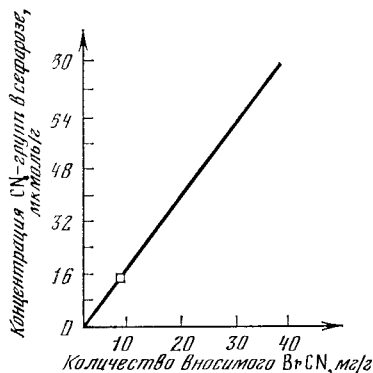


Рис. 132. Зависимость концентрации активных циановых эфиров в сефарозе 4В от количества вносимого в реакцию BrCN [Kohn, Wilchek, 1982]

Квадратиком отмечен уровень содержания Циановых групп в продажной сефарозе 4В, активированной BrCN, фирмы «Pharmacia»

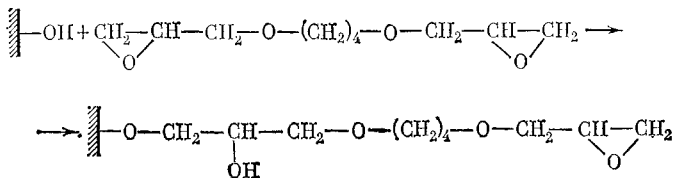
Для длительного хранения сорбент хорошо промывают смесью ацетон—диоксан—вода (60:35:5). В этой смеси без свободного доступа воздуха при температуре -20° его можно и хранить. Активность при таком хранении снижается примерно на 10% за месяц. Перед использованием сорбент следует промыть, как описано выше.

При выборе степени модификации можно ориентироваться на соответствующий график, заимствованный из цитируемой работы (рис. 132).

По данным авторов, благодаря переходу к нейтральным условиям для получения 10 г сорбента с умеренной активностью требуется всего лишь 30—50 мг BrCN вместо обычных 1—2 г (соответственно уменьшается и степень опасности отравления!). В этих условиях включается до 24% от внесенного с BrCN азота (вместо обычных 4%), причем 98% его входит в состав активных групп аффинной матрицы, между тем как в щелочных условиях в их составе оказывается лишь 7—10% включившегося азота [Kohn, Wilchek, 1982]. Позднее те же авторы предложили еще один агент для получения активированных эфиром цианата полисахаридов — 1-циан-4-диметиламинопиридин-тетрафторборат [Kohn, Wilchek, 1983]. Модификация идет еще эффективнее — включается до 50% вносимого с реагентом азота. Токсичных соединений нет, поскольку BrCN в реакции не участвует. Реактив хорошо хранится, однако его надо синтезировать, так что проще воспользоваться продажными препаратами BrCN и ТЭА.

Активация полисахаридных матриц оксиранами (эпоксиподготовка)

В качестве агента, модифицирующего и активирующего полисахаридную матрицу, нередко используют бис-оксираны, например 1,4-бис-(2,3-эпоксипропокси)-бутан, или, по другой номенклатуре, 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир. С ОН-группами матрицы в щелочной среде он образует прочную эфирную связь, создавая таким образом гидрофильный спейсер, несущий на своем конце эпоксигруппу:



В щелочной среде (рН 8,5—11) эта группа легко связывает лиганды, несущие OH- , $\text{NH}_2\text{-}$ или SH- группы.

Процедура активации состоит в следующем. 100 мл набухшей сефарозы промывают на бюхнеровской воронке 3—4 объемами деионизованной воды и суспендируют с медленным перемешиванием (как в предыдущем методе) в 50—70 мл воды. Добавляют 10 мл бис-оксипрана и 30 мл 2 М раствора NaOH, содержащего 0,2 г NaBH_4 . Суспензию перемешивают в течение ночи при комнатной температуре под тягой, затем гель тщательно промывают деионизованной водой и переносят в колбу с буфером для посадки лиганда. Другие авторы рекомендуют несколько иное соотношение тех же реагентов [Uy, Wold, 1977].

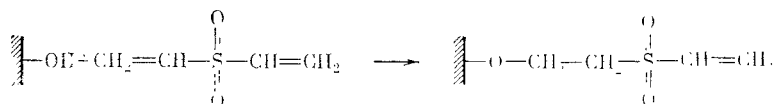
Обработанные таким образом матрицы иногда называют эпокси-активированными. Фирмы «Pharmacia» и «Sigma» поставляют в лioфилизированном виде такой сорбент под торговым названием «Ероху activated Sepharose 6В». Концевая эпокси-группа может иногда (при благоприятных стерических условиях) связаться с другой нитью геля агарозы, что приводит к повышению термостойкости эпокси-активированной сефарозы за счет некоторого снижения ее пористости. Вместо бис-оксирана для получения эпокси-активированной полисахаридной матрицы можно воспользоваться эпихлоргидрином. Активный хлор отщепляется, и оксирановая группа оказывается закрепленной на обменнике эфирной связью, но на этот раз в непосредственной близости от его поверхности (без спейсера):



Реакция идет в сильнощелочной среде, которую приходится подтитровать крешкой щелочью для нейтрализации образующейся HCl , подобно тому как это делают при активации с участием BrCN .

Активация дивинилсульфоном

Активированную двойную связь второго из приведенных выше типов обычно образуют путем обработки полисахаридной матрицы дивинилсульфоном. Одна из активных двойных связей последнего разрывается с образованием прочной эфирной связи с матрицей:

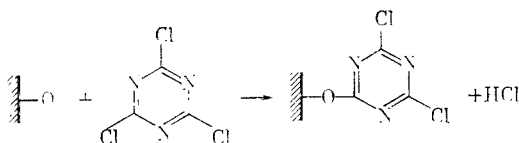


Как и в случае оксиранов, реакция протекает в сильнощелочной среде, поэтому она непригодна для активации полнакриламидо-содержащих гелей. Бифункциональный характер активатора и в этом случае приводит к некоторой дополнительной сшивке агарозы.

Ввиду токсичности и относительной дороговизны дивинилсульфона этот метод активации используется редко, и мы его подробно описывать не будем.

Активация трихлортриазином

Симметричный трихлортриазин (TsT) используется в промышленности для связывания красителей с тканью. Он охотно реагирует с гидроксильной группой полисахарида, освобождая соляную кислоту:



Оставшиеся два атома хлора обладают высокой реакционной способностью — они очень электрофильны. Реакция идет в щелочной (нейтрализация HCl) водно-органической среде, поскольку в чистой воде TsT нерастворим.

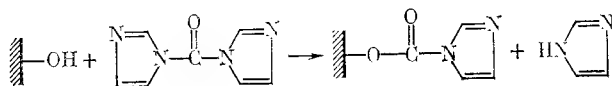
100 мл геля промывают на воронке деионизированной водой, затем суспендируют в 100 мл ацетона и перемешивают 30—45 мин при комнатной температуре. Растворяют 0,5—1 г TsT в 15—20 мл ацетона, затем добавляют такое же количество воды; эту и все последующие операции следует проводить под тягой из-за токсичности триазиона. Приливают раствор триазиона с перемешиванием к суспензии геля, перемешивают 5 мин, добавляют 10 мл 2 М NaHCO₃, перемешивают еще 5 мин, быстро фильтруют и промывают гель на воронке 0,1 М фосфатным буфером (pH 6,7) в 50%-ном ацетоне. Уравновешивают гель в буфере для посадки лиганда, например в 0,5 М боратном буфере, pH 8,7 (или в ином, не содержащем первичных аминов буфере в интервале pH 7,5—9), и вносят лиганд из расчета 0,5—1 ммоль на 1 мл геля для малых молекул или 5—10 мг на 1 мл геля для макромолекул. Суспензию перемешивают 4—12 ч на холоду или при ком-

натной температуре (в зависимости от лабильности лиганда), промывают тем же буфером от избытка лиганда и обрабатывают этаноламином или другими реагентами для блокирования незамещенных активных центров (см. ниже).

Вместо TsT можно использовать замещенный по одному из атомов хлора 2-амино-4,6-дихлортриазин или блокировать один из атомов хлора анилином в ходе реакции активации, которую вместо ацетона можно с равным успехом проводить в водном диоксане [Finlay et al., 1978]. Активированная триазином агароза дает очень прочно фиксированные сорбенты, свободные от «подтекания» лиганда, но склонные к неспецифической адсорбции веществ, содержащих ароматические группы.

Активация карбонилдии имидазолом

Реакция идет с образованием активного имидазолилкарбамата. Бетелл и соавторы предложили в 1979 г. новый способ активации агарозы в реакции с 1,4-карбонилдиимидазолом [Bethell et al., 1979]. Присоединение активатора идет за счет отщепления одного из имидазолов:



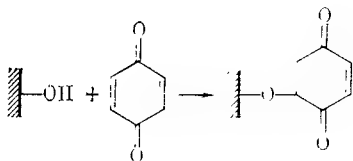
Реакцию ведут в диоксане, в который сефарозу переводят последовательными промывками водой, смесями диоксан—вода в соотношении 3 : 7 и 7 : 3, а затем чистым диоксаном. Предпочтительно использовать устойчивую к действию органических растворителей химически спитую агарозу («Sephacrose CL-6B»).

3 г влажной сефарозы суспендируют в 5 мл диоксана, добавляют 120 мг карбонилдиимидазола и встряхивают 15 мин при комнатной температуре. Затем промывают 100 мл диоксана. В виде суспензии в диоксане на холоду сорбент может храниться без утраты активности в течение нескольких месяцев. Для посадки лиганда его переводят в щелочной, например в 0,1 М боратный, буфер с pH 8,6—10.

Рассмотренные методы активации агарозы, как уже упоминалось, приводят к получению сорбентов, на которые нуклеофильная атака со стороны лиганда должна проводиться в щелочной среде. В то же время все эти сорбенты чувствительны к действию щелочи — эфирные и иные связи активных групп с агарозой постепенно разрушаются. Новый сорбент фирмы «Pierce» выгодно отличается от них заметно большей стойкостью. По данным фирмы, выпущенный ею в продажу под торговым названием «Reacti-Gel» сорбент для полного гидролиза своих активных групп при pH 8,5—9 требует 30 ч. Кроме того, он отличается низким уровнем неспецифической сорбции из-за отсутствия зарядов (как при активации BrCN — см. ниже) или гидрофобных свойств у N-алкилкарбаматной связи, фиксирующей лиганд на матрице.

Активация бензохиноном

Бензохинон — очень активный реагент. Легко и с высокой степенью замещения он присоединяется по гидроксилам полисахаридов, активируя матрицу:



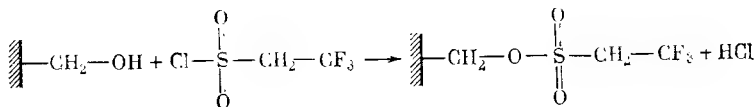
Реакция успешно протекает в слабощелочной среде — при pH 7,5—8, поэтому можно вести активацию бензохиноном агарозного компонента смешанного агарозно-полиакриламидного геля типа «Ultrogel AcA». В реакционную смесь можно вместо бензохинона вводить растворимый в этаноле гидрохинон — в слегка щелочной среде он окисляется до бензохинона. Активированные бензохиноном матрицы приобретают интенсивную окраску, по-видимому, в результате побочных реакций. Как и в случае активации триазином, образование в составе сорбента (после посадки лиганда) ароматического кольца приводит к заметному неспецифическому взаимодействию π — π -типа с ароматическими группами контактирующих с сорбентом веществ.

100 мл агарозы промывают деионизованной водой и переводят в 0,1 М фосфатный буфер (pH 8), содержащий 20 % этанола. При перемешивании к суспензии геля добавляют 0,5—1 г гидрохинона, растворенного в 30—50 мл этанола, перемешивают при комнатной температуре 1—2 ч и промывают на фильтре 20%-ным водным этанолом до полного удаления несвязавшихся реагентов, а затем 1 М NaCl и водой. Посадку лиганда ведут в 0,1 М Na-бикарбонатном буфере (pH 8) с перемешиванием в течение ночи на холоду. Соотношение количеств лиганда и геля такое же, как в случае активации агарозы трихлортриазином. После окончания посадки избыток лиганда вымывают из геля тем же буфером, а затем его дважды промывают 0,1 М Na-ацетатным буфером (pH 4) и дважды 1 М NaCl, после чего проводят блокирование незамещенных активных центров.

В. М. Степанов и соавторы с помощью бензохинона осуществляли посадку лиганда (бацитрацина) на матрицу макропористого, модифицированного присоединением аминогруппы силикагеля типа «Силохром» (СССР). Порядок проведения реакции был иным: сначала бацитрацин по аминогруппе лизина связывали с бензохиноном в чистом диметилформамиде (ДМФ), а затем вносили «аминосилохром» в смеси равных объемов ДМФ и 0,1 М NaHCO_3 (pH 10) и перемешивали в течение нескольких часов при 20°. Теперь активированный бензохиноном лиганд присоединялся по аминогруппе матрицы [Stepanov et al., 1981]. Преимущества использования в качестве матрицы силикагеля при решении стоявшей перед авторами задачи создания сорбента для очистки протеаз обсуждаются ниже.

Активация трезилхлоридом

Упомянутый выше новый вариант активации полисахаридных матриц, позволяющий вести посадку лиганда в мягких условиях [Nilsson, Mosbach, 1981], заслуживает более подробного рассмотрения. В качестве активирующего агента авторы использовали трифторэтилсульфонилхлорид — торговое название «tresyl chloride» (фирма «Fluka»). Реакция идет в органическом растворителе с освобождением HCl:



Присоединение лиганда с отщеплением трифторэтилсульфокислоты, как было показано выше, проводится в водном буфере с pH 7,5.

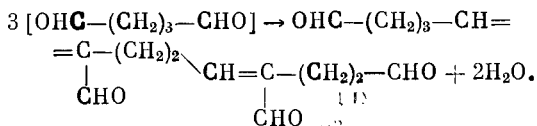
Сефарозу сначала постепенно переводили в сухой ацетон, промывая на фильтре последовательно серией водно-ацетоновых смесей с увеличивающимся содержанием ацетона, потом обычным и высушенным над молекулярным ситом ацетоном. Промытый гель переносили в смесь ацетона с пиридином (1 : 9) и при энергичном перемешивании добавляли по каплям трезилхлорид (0,2—1 мл на 32 г. влажной сефарозы). Реакция шла в течение 10 мин, после чего гель промывками ацетоном и серией смесей ацетона с 1 мМ водным раствором HCl постепенно переводили в 1 мМ HCl, где его можно хранить на холоду без инактивации по крайней мере в течение трех месяцев. Для посадки лиганд (трипсин, ингибитор трипсина, БСА, N⁶-(6-аминогексил)-АМФ) растворяли в холодном 0,2 М Na-бикарбонатном или Na-фосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 0,5 М NaCl, вносили туда равный объем промытого тем же буфером сорбента и инкубировали с осторожным перемешиванием на холоду. После окончания посадки лиганда аффинный сорбент обильно промывали буфером, затем (для удаления неспецифически сорбировавшихся примесей) 0,2 М раствором Na-ацетата (pH 3) с 0,5 М NaCl, самим 0,5 М NaCl, водой и снова буфером. Авторы указывают, что при хранении активированного геля в течение ночи на холоду в 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 7,5) инактивация практически не заметна. В тех же условиях активированная BrCN-сефароза снижает свою активность вдвое за 30 мин. Активированный трезилхлоридом полисахаридный гель можно лиофилизировать или хранить в виде суспензии в ацетоне.

В той же работе дана пропись активации трезилхлоридом продажного, модифицированного глицерилпропилсиланом силикагеля («LiChrosorb DiOL», фирма «Merck»), получения на его основе N⁶-(6-аминогексил)-АМФ-силикагеля и аффинная хроматография на нем при высоком давлении для разделения смеси БСА и двух дегидрогеназ путем аффинной конкурентной элюции. Весь процесс фракционирования занимал 15 мин. Кроме того, авторы проверили прочность посадки белка на активированную трезилхлоридом матрицу. Оказалось, что лишь несколько процентов радиоактивно-меченного альбу-

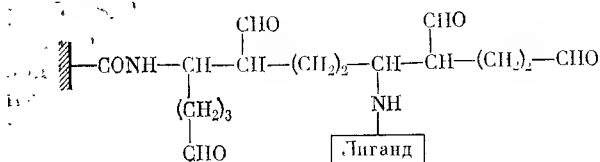
мина снимается с такой активированной сефарозы за 48 ч в 0,2 М Трис-НСl (рН 7,8) при 35°. В тех же условиях BrCN-активированная сефароза теряет более 20% связанного с ней белка. Годом ранее те же авторы описали аналогичную реакцию активации полисахаридных матриц с помощью другого продажного препарата — *n*-толуолсульфонилхлорида (торговое название — «tosyl chloride») [Nilsson, Mosbach, 1980].

Активация глютаральдегидом

Этот тип активации наиболее удобен для гелей, содержащих амидные группы, в частности для смешанных гелей типа «Ultrogel АсА». В мягких условиях (рН 7,4—7,6) образуется активированная соседством альдегидной группы двойная связь. Механизм ее образования обусловлен способностью трех молекул глютарового альдегида с отщеплением двух молекул воды образовывать своего рода тример, содержащий две двойные связи указанного типа:



Присоединение по амидной группе матрицы идет с насыщением одной двойной связи, а присоединение лиганда через его нуклеофильную (например, NH_2 -) группу происходит с насыщением второй двойной связи; так что вся цепь, связывающая лиганд с матрицей, приобретает следующий вид:



Эта цепь одновременно представляет собой гидрофильный и лишенный заряда спейсер. Она достаточно прочна, и «подтекания» лиганда в процесс использования сорбента не происходит.

Фирма «IBF» (Франция) рекомендует следующую процедуру активации смешанных гелей типа «Ultrogel АсА». 100 мл геля промывают на бюхнеровской воронке 3—4 объемами воды и таким же количеством 0,5 М фосфатного буфера, рН 7,6 (можно использовать и другие буферы с рН 6,9—8,5, не содержащие первичных аминогрупп). Избыток жидкости осторожно отсасывают, а гель переносят в колбу, содержащую 100 мл 25%-ного водного раствора глютаральдегида. Следует проверить, что рН суспензии равен 7,4, и в случае необходимости подтитровать ее. Механической мешалкой с умеренной скоростью вращения перемешивают гель в течение 18 ч на водяной бане при 37°. Затем гель промывают на фильтре 15—20 объемами воды и

переводят его в буфер для посадки лиганда, например 0,5 М фосфатный, рН 7,6.

Фирмы «IBF» и «ЛКВ» производят готовые активированные глютаральдегидом аффинные сорбенты на основе смешанных агарозно-полиакриламидных гелей («Act-Ultrogel AcA 22» и «Act-Magnogel AcA 44»). Рекомендации по посадке лигандов на такие сорбенты даны ниже, вместе с рекомендациями по использованию продажных вариантов активированной сефарозы.

Матрицы типа «Ultrogel AcA» можно активировать по амидной группе ПААГ реакцией с гидразином. Промежуточные гидразиды затем обрабатывают азотистокислым натрием и соляной кислотой с образованием весьма активного ацилазида [Cuatrecasas, Anfinsen, 1971]. Однако ацилазид неустойчив, получающийся сорбент нестабилен, а стерические препятствия мешают закреплению на нем высокомолекулярных лигандов. Второй из этих недостатков обходили, используя вместо гидразина дигидразид янтарной кислоты [Parikh et al., 1974]. С его помощью активировали сефарозу, в которой гликольные группы предварительно окисляли до альдегидов периодатом натрия. Окисленную таким образом сефарозу можно использовать и более широко — для присоединения в мягких условиях любых лигандов, содержащих первичные аминогруппы. Образующиеся при этом шиффовы основания нестойки, и их следует восстанавливать до устойчивых вторичных аминов действием боргидрида или (лучше) цианоборгидрида натрия.

Описано присоединение альдегидной группы к BrCN-активированной агарозе [Korpela, Hinkkanen, 1976] и к ПААГ с использованием «Aminoethyl Bio-Gel P-150» [Findler, Gray, 1978]. Эти методы активации полисахаридных матриц, как и использование ацилазидных сорбентов, широкого распространения не получили, и мы на них подробнее останавливаться не будем.

СПЕЙСЕРЫ

Как уже указывалось, для устранения стерических препятствий присоединению макромолекулярных лигандов между ними и матрицей бывает необходимо ввести молекулу «спейсера». Чаще всего эту роль выполняют линейные алифатические цепи, содержащие 6—8 звеньев.

При выборе спейсера, помимо длины, следует учесть степень его гидрофобности, поскольку от этого может зависеть неспецифическая сорбция на матрице. Необходимо также выбрать химическую группу, которая окажется на свободном конце спейсера; к этой группе должен присоединяться лиганд. Что касается присоединения спейсера к матрице, то здесь используются те же приемы, какие были описаны для присоединения лигандов к активированным матрицам, поэтому на ближайшем к матрице конце спейсера почти всегда располагается аминогруппа.

Чаще всего в качестве спейсеров используют простейшие линейные молекулы: 1,6-диаминогексан (гексаметилендиамин) и 6-амино-

гексановую (6-аминокапроновую) кислоту; соответственно на свободном конце спейсера оказывается аминогруппа или карбоксил. Длина таких спейсеров достаточна для того, чтобы обеспечить свободу присоединения белкового лиганда, и вместе с тем еще не настолько велика, чтобы алифатическая цепочка проявляла излишнюю гидрофобность. Тем не менее в некоторых случаях предпочитают использовать более гидрофильные цепочки спейсеров, состоящих из производных алифатических спиртов, например 1,3-диаминопропанола-2, или содержащих пептидные связи. Например, лиганды гидрофобной природы предпочтительно присоединять к более гидрофильным спейсерам во избежание инактивации лиганда за счет гидрофобного взаимодействия с собственным спейсером. Гидрофильные спейсеры любой длины можно конструировать чередованием присоединения 1,3-диаминопропанола-2 и бромуксусной кислоты [Turkova, 1978].

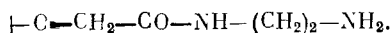
Иногда, наоборот, выгодно иметь в составе спейсера фенильный остаток, с тем чтобы биоспецифической посадке вещества на лиганд способствовало взаимодействие ароматических групп. Описано использование для образования спейсера *n*-фенилендиамин [Porath, Aхén, 1976].

Как правило, исследователю нет нужды самому заботиться о введении спейсера, так как в продаже имеются готовые матрицы на основе как сефарозы, так и смешанного агарозно-полиакриламидного геля с уже присоединенными спейсерами. Фирма «Pharmacia» выпускает такие матрицы в виде лиофилизированных порошков под торговыми наименованиями «АН-Sepharose 4В» и «СН-Sepharose 4В». В их составе через первичные аминогруппы к ВгСN-активированной 4%-ной агарозе присоединены соответственно 1,6-диаминогексан и 6-аминогексановая кислота. Первая из матриц содержит 6—10, а вторая — 10—14 мкмоль спейсерных молекул в 1 мл набухшего геля. Аналогичные матрицы поставяет фирма «Sigma». Фирмы «IBF» и «LKB» выпускают матрицы с такими же спейсерами, но на основе агарозно-полиакриламидного геля под торговыми наименованиями «HMD-Ultrogel AcA 34» и «AC-Ultrogel AcA 34» (HMD обозначает гексаметилендиамин, а AC — 6-аминокапроновую кислоту; гель содержит 3% полиакриламида и 4% агарозы). Содержание спейсерных групп в 1 мл влажных гелей — как у соответствующих матриц фирмы «Pharmacia».

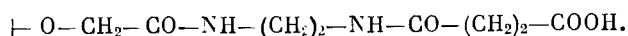
Шестичленные алифатические спейсеры не отличаются высокой степенью гидрофобности, и все же следует иметь в виду возможность различного рода нежелательных явлений, обусловленных такой гидрофобностью. Например, известны случаи ложной биоспецифичности связывания фермента с аффинным сорбентом, когда попытки очистки на таком же сорбенте фермента с такой же биологической специфичностью, но полученного из другого объекта кончались полной неудачей. Причина, как оказалось, состояла в различии гидрофобных свойств поверхностей белковых молекул вдали от активных центров этих ферментов, а связывание одного из них носило гидрофобный характер [O'Carra et al., 1974]. Те же авторы описали интересное яв-

ление лиганд-зависимого гидрофобного связывания фермента. Оно развивалось только после биоспецифической посадки фермента на лиганд и проявлялось в затрудненности конкурентной, биоспецифической элюции фермента. Связывание было тем сильнее, чем дольше фермент оставался соединенным с комплексом лиганда и гидрофобного спейсера. При замене спейсера гидрофильным этот эффект не проявлялся.

Фирма «Bio-Rad» в своих гелях использует гидрофильные спейсеры. Так, агарозная матрица «Affi-Gel 102» несет спейсеры с аминок группой на конце:



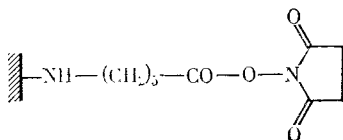
Матрицы типа «Affi-Gel 202» содержат более длинные гидрофильные спейсеры, оканчивающиеся карбоксильной группой. Они имеют в своей цепочке две пептидные связи:



Содержание спейсерных групп в обеих матрицах составляет 15 мкмоль на 1 мл влажного геля. Эта же фирма выпускает и два геля для аффинной хроматографии на чисто полиакриламидной основе с одинаковыми короткими спейсерами следующего вида: $\text{—CO—NH—(CH}_2\text{)}_2\text{—NH}_2$. Их торговые названия — «Aminoethyl Bio-Gel P2» и «Aminoethyl Bio-Gel P150». Очевидно, эти гели отличаются друг от друга по своей пористости.

АКТИВИРОВАННЫЕ СПЕЙСЕРЫ

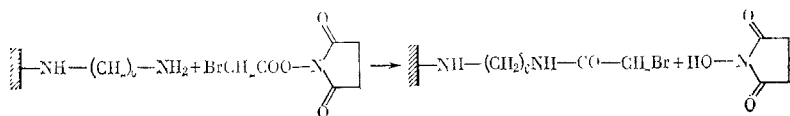
Рассмотренные спейсеры оканчиваются химически неактивными группами, и для присоединения лигандов они должны быть предварительно активированы. Посадку лигандов можно вести и с помощью карбодиимидов. В продаже имеются и готовые матрицы с уже активированными лигандами. Так, фирма «Pharmacia» производит матрицу, названную «Activated CN-Sephrose 4B», у которой спейсер (6-аминогексановая кислота) активирован этерификацией концевой карбоксила N-оксисукцинимидом:



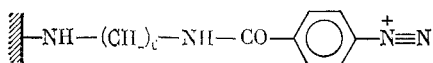
Присоединение лиганда по первичной аминогруппе происходит в мягких условиях в течение одного часа, что очень важно для лабильных лигандов. N-оксисукцинимид отщепляется, и на его место надежной пептидной связью присоединяется лиганд. Фактически с готовыми активированными гидрофильными спейсерами мы уже столкнулись выше, познакомившись с матрицами типов «Epoxy-activated Sepharose 6B», «Act-Ultrogel AcA 22» и «Act-Magnogel AcA

44». Процедура посадки лигандов на активированные спейсеры описана ниже.

Спейсеры, оканчивающиеся аминогруппой, можно активировать обработкой О-бромацетил-N-оксисукцинимидом, в результате чего на конце спейсера появляется весьма активный атом брома:

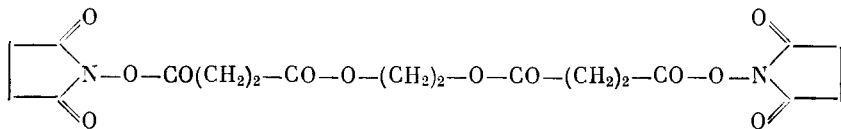


Другой вариант активации таких спейсеров приводит к образованию диазониевого производного:



Оно легко реагирует с белками по тирозину и гистидину; образующаяся при этом азо-связь заряда уже не несет. Модификация начинается с обработки «АН-Sephарозе 4В» *n*-нитробензоилазидом в щелочном водном растворе диметилформамида. Затем *n*-нитробензамидное производное сефарозы дитионитом натрия восстанавливают до *n*-аминобензамидного, а последнее действием NaNO_2 и HCl преобразуют в конечный продукт. Подробности обеих операций активирования «АН-Sephарозе 4В» можно найти в работе [Cuatrecasas, Anfinsen, 1971]. Вторая из них кажется несколько громоздкой, но она окушается рядом преимуществ получающегося сорбента: 1) посадка лиганда на него идет быстро и до конца даже при 0° в диапазоне pH 5—8; 2) неиспользованные диазониевые группы легко блокировать фенолом; 3) ариламинные предшественники диазониевого производного можно заготовить в большом количестве — они хорошо хранятся; 4) азо-связь лиганда со спейсером достаточно жестка, однако в том случае, если очищаемое вещество не удастся десорбировать с лиганда, его можно снять вместе с лигандом восстановительным разрывом этой связи; 5) при pH 5—6 имидазол реагирует с диазониевой группой охотнее, чем фенол, при pH ≥ 7 обе реакции идут одинаково, а в кислой области лучше других реагирует с диазонием индол триптофана. Последнее обстоятельство можно использовать для ориентирования лиганда по отношению к спейсеру с позиций повышения его аффинного сродства к очищаемому веществу [Cohen, 1974].

Для активации спейсера в составе «АН-Sephарозе 4В» с одновременной посадкой на него белка (трипсина) через длинную гидрофильную цепочку Абделла и соавторы использовали синтезированный ими этиленгликоль-бис-(сукцинимидсукцинат):



По-видимому, этот бифункциональный агент представляет интерес и для связывания белков с образованием нерастворимой пространственной сетки, например для целей иммунопреципитации [Abdella et al., 19].

ЛИГАНДЫ С ИНДИВИДУАЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Все разнообразие биологически активных молекул и их аналогов, которые могут быть использованы в качестве лигандов, не поддается перечислению. Тем не менее имеет смысл назвать некоторые (иногда очень широкие, а иногда ограниченные) группы веществ и даже индивидуальные вещества, чаще других используемые в качестве лигандов. Всем им свойственна определенная биоспецифичность — индивидуальная или групповая. Под первой будем понимать строгую взаимную специфичность («сродство») двух молекул, например антигена и антитела; под второй — такой вид биоспецифического взаимодействия, когда лиганд может связывать целую группу родственных в этом смысле веществ. Примером может служить никотинаденин-нуклеотид, взаимодействующий со всеми ферментами, для которых он является коферментом.

Назовем некоторые типичные лиганды с индивидуальной специфичностью. Мы не будем пока интересоваться химической природой лиганда и возможностями его закрепления на матрице; об этом речь впереди. Сейчас попытаемся только сгруппировать наиболее употребительные типы лигандов по их функциональным признакам. Впрочем, одно замечание общего характера уместно сделать уже здесь: в качестве лигандов нежелательно использовать вещества с ярко выраженной гидрофобностью, а также богатые ионогенными группами. В обоих случаях трудно будет избежать неспецифической сорбции примесей на таких лигандах.

В качестве аффинных лигандов для ферментов (а они, пожалуй, представляют наибольший практический интерес) могут выступать субстраты соответствующих ферментативных реакций и их аналоги, продукты этих реакций, ингибиторы и коферменты, аллостерические эффекторы, ионы металлов, а также специфические для каждого из ферментов антитела.

Обратная ситуация, когда лигандами служат ферменты, может встретиться при решении задачи выделения и очистки их субстратов и других компонентов ферментативной системы. Использование в качестве аффинных партнеров пары субстрат—фермент, разумеется, предполагает такие условия эксперимента, когда фермент не может осуществить каталитический акт преобразования субстрата, а только связывается с ним в комплекс, например в условиях отсутствия второго субстрата, необходимых ионов, при неблагоприятном значении рН и т. д.

Особый и важный раздел биохимии, особенно в прикладном аспекте, составляет получение иммобилизованных ферментов и даже целых ферментных систем, позволяющих проводить катализ в условиях, когда продукты реакции легко отделяются от ферментов, вытекая из

колонки или оставаясь в супернатанте после отстаивания ферментных матриц в объеме. Естественно, что в этом случае, наоборот, в окружении иммобилизованного фермента создаются условия для осуществления не только связывания субстрата, но и катализа соответствующей реакции. Иммобилизованные ферменты остаются за рамками данной книги.

Использование белков-антигенов в качестве лигандов для очистки специфических антител на иммуносорбентах было описано в предыдущей книге этой серии [Остерман, 1983]. Там же была рассмотрена возможность связывания любых антител на матрице, несущей белок А из *Staphylococcus aureus*. Обе эти системы с полным правом можно включить в перечень аффинных хроматографических систем. Естественно, что иммуносорбенты используются и в обратном варианте, когда с помощью лигандов-антител производится очистка антигенов белковой природы или гаптоенов.

Белки-рецепторы могут служить лигандами для связывания гормонов и других низкомолекулярных эффекторов, транспортные белки плазмы и белки-переносчики клеточных мембран — для связывания и очистки своих низкомолекулярных партнеров. Белки-регуляторы и участники процессов матричного синтеза, используемые в качестве лигандов, позволяют решать задачи по вычленению регуляторных участков нуклеиновых матриц и выявлению других компонентов синтезирующих систем. То же самое относится к системам выработки и транспорта энергии.

Хотя синтез аффинного сорбента с индивидуальной специфичностью при наличии одной из продажных активированных матриц и не представляет особого труда, он все же требует наличия достаточного количества очищенного аффинного лиганда, не инактивирующегося в условиях его посадки на матрицу. Заметим, что после посадки лиганда на матрицу прочность связывания с ним биоспецифического партнера может сильно уменьшиться по сравнению с тем уровнем, который наблюдался при образовании их свободного комплекса в растворе (иной раз константа диссоциации комплекса на сорбенте может оказаться на три порядка выше, чем в растворе). Это обстоятельство играет важную роль при осуществлении конкурентной аффинной элюции вещества с сорбента с использованием свободного лиганда (см. ниже). Тем не менее прочность аффинного связывания в большинстве случаев оказывается достаточной для удержания нужного вещества на матрице в условиях отмывки с нее всех сопутствующих ему примесей. Нередко прочность комплекса вещества с аффинным лигандом увеличивается, если последний имеет некоторую свободу ориентирования в пространстве, т. е. закреплен на матрице с помощью спейсера.

ЛИГАНДЫ С ГРУППОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Аффинные сорбенты с групповой специфичностью в некоторых случаях не уступают по избирательности сорбентам с индивидуальной специфичностью, а иногда даже имеют свои преимущества. Так,

сорбент с групповой специфичностью будет ничем не хуже индивидуального, если аффинная очистка производится из такой смеси, где очищаемое вещество является заведомо единственным представителем группы веществ, специфичных для сорбента.

Аффинный сорбент с групповой специфичностью имеет явное преимущество в том случае, когда ставится задача не только очистки, но и разделения нескольких веществ, наделенных сродством к одному и тому же лиганду. Если степень этого сродства не одинакова для разных веществ группы или если удается подобрать для них различные (специфические) конкурентные элюенты, то разделение веществ может быть осуществлено хроматографически, в ходе их поочередной элюции с сорбента, что не удалось бы сделать в случае лиганда, обладающего сугубо индивидуальной специфичностью. С позиций очистки одного вещества это же положение дел можно сформулировать следующим образом: снижение избирательности сорбции при использовании сорбентов с групповой специфичностью часто удается компенсировать за счет избирательности аффинной конкурентной элюции.

Не удивительно поэтому, что популярность и сфера применения аффинных сорбентов с групповой специфичностью в последние годы быстро увеличиваются, а вместе с ними растет и список таких сорбентов, поставляемых в готовом виде. Нам необходимо познакомиться с торговыми наименованиями, особенностями и областями использования важнейших из них. Не будем загромождать изложение их техническими характеристиками (емкость, пористость, рабочий диапазон pH). Иногда эти параметры будут очерчиваться самой сферой применения сорбентов; во всяком случае, их нетрудно найти в каталогах фирм, которые мы упомянем. Рубрикация дальнейшего изложения построена по наименованиям самих лигандов.

Лектины

Лектинами называют белки или гликопротеиды растительного (фитогемагглютинины) или животного происхождения, проявляющие более или менее избирательное сродство к остаткам индивидуальных сахаров или групп сходных сахаров. Разнообразие остатков сахаров, часто встречающихся в природе, невелико, но они входят в самых различных комбинациях во множество биологически важных соединений: полисахаридов, мукополисахаридов, гликопротеидов, гликолипидов и др. Многие из этих соединений участвуют в построении клеточных мембран. Подобно антителам, лектины обладают более чем одним участком связывания сахаров, что обуславливает их способность агглютинировать эритроциты и другие клетки, отбирая их по классам, например опухолевые или эмбриональные. Используемые в качестве аффинных лигандов, лектины позволяют решать важные задачи очистки содержащих сахара компонентов плазмы, гликопротеидов клеточных мембран и др.

Из числа известных лектинов в аффинной хроматографии чаще других используется конканавалин А («Con A»), получаемый из бобов

Canavalia ensiformis. Con A связывает молекулы, содержащие α -D-маннопиранозил, α -D-глюкопиранозил и стерически сходные с ними остатки. С помощью продажных сорбентов с закрепленным конканавалином A типов «Con A-Sepharose» (фирма «Pharmacia»), «AGCon A» (фирма «PL-biochemicals») и «Con A-Ultrogel» (фирмы «LKB», «IBF») ведут очистку ферментов, в состав которых входят соответствующие сахара (ряда гидролаз, фосфатаз, аминотрансфераз и др.), и углеводсодержащих компонентов плазмы, в том числе иммуноглобулинов, особенно богатых сахарами (типа IgM). Конканавалин A связывает интерферон фибробластов человека, ряд гонадотропных гормонов, разнообразные рецепторные структуры, лежащие на наружной поверхности клеточных мембран. Последние удается перевести в раствор только с помощью детергентов, например 1%-ного раствора дезоксихолата натрия, что, однако, не очень мешает их взаимодействию с конканавалином A.

Лектин, выделяемый из обычной чечевицы *Lens culinaris* (готовые обменники — «Lentil Lectin-Sepharose 4B», «LcA-Ultrogel» и др.), обладает сродством к остаткам α -D-глюкозы и α -D-маннозы. Он еще менее, чем Con A, чувствителен к присутствию в среде дезоксихолата натрия и потому особенно удобен для очистки гликопротеидов клеточных мембран, прочих антигенов наружной поверхности клеток, а также капсид вирусов.

Лектин из зародышей пшеницы связывает N-ацетилглюкозаминильные остатки. Помимо очистки и фракционирования полисахаридов или гликопротеидов, α_2 -макроглобина, гаптоглобина и церуплазмينا из плазмы, секреторных гликопротеидов типа муцина, этот лектин находит применение для разделения целых клеток (по их поверхностным характеристикам), например T-лимфоцитов, а также клеточных органелл. Для этой цели фирма «Pharmacia» выпускает его иммобилизованным на специальной крупногранулированной 6%-ной сефарозе («Wheat germ Lectin-Sepharose 6MB»). Сферические гранулы диаметром 200—300 мкм не препятствуют свободному передвижению целых клеток с подвижной фазой. Аффинная сорбция клеток идет только на поверхности гранул. Аналогичный лектин фирмы «PL-biochemicals» закреплен в гранулах агарозы обычных размеров.

Здесь нет места приводить полный список лектинов, поставляемых в виде готовых матриц. Наиболее полный их список можно найти в каталоге фирмы «PL-biochemicals». Индивидуальные особенности различных лектинов известны специалистам. Обратная задача — очистка лектинов — решается с помощью аффинных сорбентов, у которых лигандами являются различные сахара и аминосахара. Разнообразные сорбенты этого типа производят фирмы «PL-biochemicals» и «Pierce».

Кофермент A

Этот кофермент участвует во множестве ферментативных реакций и имеет широкое поле применения в качестве аффинного лиганда с групповой специфичностью. Его закрепляют на матрице через

аминогруппу остатка аденина, оставляя свободным активный концевой тиоловый радикал [Chibata et al., 1974]. В готовом виде соответствующий аффинный сорбент поставляется фирмой «PL-biochemicals».

Нуклеозидфосфаты

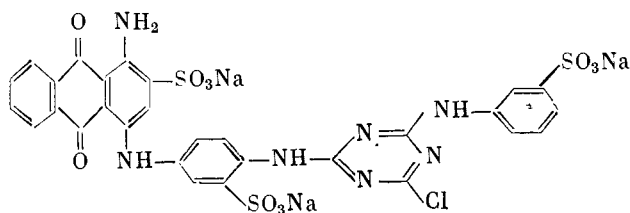
В качестве аффинных лигандов с групповой специфичностью часто используются нуклеозидфосфаты. Наиболее полный набор соответствующих сорбентов предлагает фирма «PL-biochemicals». В ее каталоге фигурируют моно-, ди- и трифосфаты аденозина, гуанозина и уридина, а также аденозин-3',5'-циклофосфат, роль которого в качестве активатора различных протеинкиназ за последние годы привлекает особенный интерес исследователей. Описана иммобилизация сAMP на сефарозе через 1,6-диаминогексан в лабораторных условиях [Jergil, Mosbach, 1974]. Фирма «Pharmacia» выпускает два готовых аффинных сорбента: «5'AMP-Sepharose 4B» и «2',5'ADP-Sepharose 4B». Такой выбор лигандов определяется тем обстоятельством, что соответствующие сорбенты обладают групповой специфичностью ко многим ферментам, использующим в качестве коферментов НАД⁺ и НАДФ⁺ (дегидрогеназам, киназам, редуктазам и др.). Закрепление на сефарозе (через спейсер) ведут в обоих случаях по аминогруппе остатка аденина. В качестве аффинных элюентов можно использовать растворы НАД⁺ и НАДФ⁺. Фирма «Sigma» производит на основе агарозы аффинные сорбенты, где в качестве лигандов выступают сами коферменты НАД и НАДФ.

Для быстрой очистки высоколабильной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из эритроцитов человека в качестве лиганда можно использовать окисленную форму НАДФ⁺. Описано приготовление соответствующего аффинного сорбента на основе BrCN-активированной сефарозы [Crane, Goffredo, 1983]. Конкурентную элюцию осуществляют 10 мкМ раствором НАДФ⁺ в присутствии 0,6 М KCl.

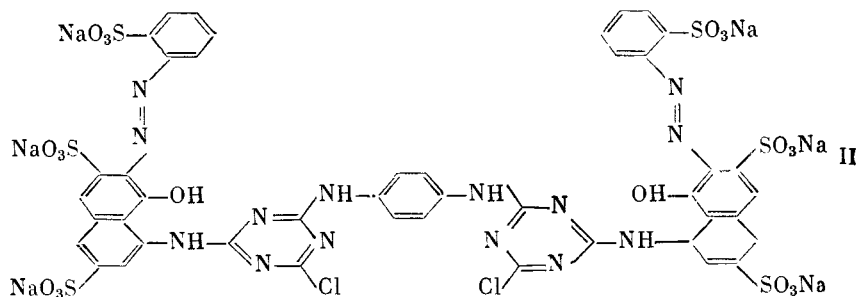
Недавно был описан способ химического превращения продажного сорбента «5'AMP-Sepharose 4B» в сAMP-сефарозу. Каталитическую субъединицу сAMP-зависимой протеинкиназы с такого сорбента можно элюировать 1 М NaCl, а регуляторную — 20%-ным раствором этиленгликоля [Bywater, Gustavsson, 1980] или раствором сAMP, т. е. конкурентно (см. ниже).

Триазиновые красители

Эти красители (торговое название — «проционовые красители») образуют особую группу лигандов, используемых для очистки ферментов, интерферона и других белков. Приведем структурные формулы двух наиболее распространенных красителей этого типа:



I



Непосвященному читателю может показаться неоправданным использование очень сложных и, по-видимому, дорогостоящих соединений. На самом деле все обстоит как раз наоборот. Это самые дешевые из всех лигандов. Дело в том, что все они являются красителями для текстиля, так что их промышленный выпуск измеряется не граммами, а тоннами. Использование красителей в качестве лигандов также легко понять. Тысячелетиями человечество отбирало из природных пигментов, главным образом растительного происхождения, такие, которые не смываются с шерсти, т. е. обладают очень высоким сродством к белкам. Современной химии оставалось только расшифровать структуру этих пигментов и заняться отысканием путей искусственного синтеза их и их аналогов.

Хотя, как будет видно из дальнейшего, природа прочной связи этих красителей с белками далеко не выяснена и по сей день, попытка использовать их в качестве лигандов для аффинной хроматографии была очень естественной и дала весьма ценные результаты. Красители присоединяют к химически сшитой агарозе по реакционноспособному остатку трихлортриазина. Способ присоединения очень прост: агарозу добавляют к водному раствору краски, затем вносят до 2% твердого NaCl и раствор защелачивают до pH 10,5 (Na_2CO_3), что приводит к образованию нуклеофильных групп и присоединению красителя к матрице в ходе длительной инкубации [Lowe et al., 1981].

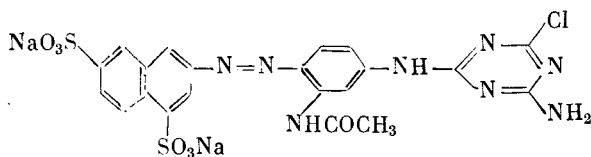
Промышленные порошки красителей имеют множество добавок, которые стараются предварительно удалить промывкой эфиром и осаждением красителя спиртом из водного раствора. Очищенные красители (по данным ТСХ) остаются достаточно гетерогенными, что может осложнять картину аффинной хроматографии. Особенно широкое применение в качестве лиганда сейчас получил первый из изображенных выше красителей — «Cibacron Blue F3GA» (в этом наименовании фигурирует название фирмы «Ciba»; другое его торговое обозначение — «Procion Blue H-B»).

Ввиду невозможного различия концентраций лиганда (а она должна быть небольшой), а также из-за отмеченной выше гетерогенности аффинные сорбенты на основе «Cibacron Blue», выпускаемые разными фирмами («Pharmacia», «Bio-Rad», «LKB», «Pierce» и др.), могут заметно отличаться друг от друга по своим характеристикам. В связи с этим, а также учитывая сложный ионно-гидрофобный характер

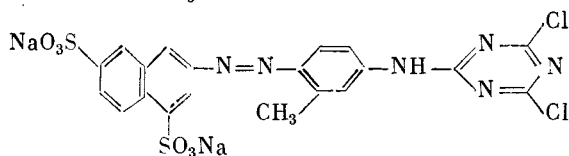
взаимодействия красителя с белками, параметры хроматографии (рН, ионную силу, температуру) следует подбирать специально для решения каждой конкретной задачи и проверять их оптимальность при переходе к другой партии сорбента (даже той же фирмы). Для элюции белков чаще всего используют ступенчатые или линейные градиенты концентрации солей, иногда изменение рН, растворы детергентов и хаотропных агентов, а также конкурентные элюенты — фосфаты, коферменты, нуклеотиды и полиолы.

Причины специфичности взаимодействия «Cibacron Blue» с белками остаются неясными. Первоначально этот лиганд был успешно использован для очистки ряда дегидрогеназ, киназ и мутаз — ферментов, имеющих в активном центре пространственную структуру так называемой «динуклеотидной складки», образованной примерно 120 аминокислотами. В этой структуре связываются НАД, АДФ или АТР. Было замечено, что пространственная конфигурация красителя напоминает таковую для НАД, причем сульфогруппы расположены примерно в тех же местах, что фосфаты у кофермента. Было высказано предположение, что для ферментов этого типа «Cibacron Blue» выступает в качестве аналога НАД [Thompson et al., 1975]. Однако в дальнейшем спектр ферментов, связывающихся с красителем, сильно расширился: в него вошли CoA-зависимые ферменты, гидролазы, ацетил- и фосфорибозилтрансферазы, РНК- и ДНК-специфичные нуклеазы, полимеразы, рестриктазы, фосфорилазы, фосфодиэстеразы, аминотрансферазы, сульфогидролазы, декарбоксилазы, синтетазы, ряд белков крови, включая сывороточный альбумин, факторы свертывания, комплемент и, наконец, интерферон [Lowe et al., 1981]. Поэтому Йон предлагает отнести «Cibacron Blue» к числу имфилитов — сорбентов со смешанной ионно-гидрофобной функцией, для которых некая биоспецифичность получается в результате случайного пространственного соответствия комбинации этих функций какому-то участку белка. Если этот участок включает в себя один из активных центров фермента или если в результате взаимодействия с коферментом, субстратом или ингибитором пространственная конфигурация фермента изменяется так, что упомянутое соответствие нарушается, то становится возможной конкурентная аффинная элюция белка с колонки «Cibacron Blue» [Yon, 1981]. Вместе с тем отмечалось, что краситель «Procion Red HE3B» имеет большее сродство к НАДФ⁺-зависимым дегидрогеназам и киназам, но меньшее — к НАД⁺-зависимым, чем «Cibacron Blue». Лове и соавторы обследовали связывание одной из дегидрогеназ на серии колонок сефарозы 4В, модифицированных десятью различными триазиновыми красителями. Все они проявляли различную степень сродства к ферменту, но наибольшее впечатление производят различия в поведении двух желтых красителей: «Procion Yellow H-A» и «Procion Yellow MX-R». Ниже приведены их структурные формулы, для того чтобы показать степень сходства.

Между тем краситель III вовсе не сорбирует данный фермент, в то время как с колонки сефарозы, модифицированной красителем IV, фермент удается элюировать лишь 0,84 М KCl [Lowe et al., 1980].



III



IV

Недавно Хьюз и соавторы обнаружили, что связыванию некоторых белков на проционовых красителях весьма способствуют небольшие концентрации ионов переходных металлов (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+}). Для некоторых белков этот эффект высокоспецифичен в отношении как иона, так и красителя; для других — связывание стимулируется целым рядом ионов. Элюцию иногда удается вести хеллирующим агентом [Hughes et al., 1982]. Наконец, известно, что триазиновые красители, в частности «Cibacron Blue», обнаруживают сродство к целому ряду весьма различных ферментов, которые объединяет только то обстоятельство, что они взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами.

Все это пока не находит удовлетворительного объяснения, и механизм избирательного связывания триазиновых красителей с белками остается загадкой. Тем не менее на практике аффинная хроматография на «Cibacron Blue» оказывается зачастую очень эффективной. Например, очистку интерферона для терапевтических целей удается осуществить только с ее помощью — ионообменная хроматография и даже использование иммуносорбентов не могут с ней конкурировать. Колонки с иммобилизованными проционовыми красителями используют для удаления примесей из почти гомогенных белков, например альбумина из препаратов IgG, для разделения изоферментов, отделения функционально активных ферментов от неактивных, мутантных ферментов от диких и т. д. Механизм такого фракционирования непонятен. Между тем емкость сорбентов с красителями в 10—100 раз выше, чем у аффинных сорбентов с иммобилизованными нуклеотидами, а связь триазинов с сефарозой заметно прочнее, чем обычная связь лигандов после активации сефарозы BrCN . Все это наряду с дешевизной определяет растущую популярность аффинных сорбентов с проционовыми красителями.

Перед использованием колонки с аффинным сорбентом ее имеет смысл промыть раствором бычьего сывороточного альбумина (2 мг/мл). Было замечено, что в результате этого улучшается качество очистки и фракционирования методом конкурентной элюции целого ряда ферментов. По-видимому, БСА блокирует на сорбенте места неспецифической сорбции ферментов [Ramadoss et al., 1983].

Почти все фирмы, выпускающие готовые аффинные сорбенты, поставляют также и сорбенты на основе «Cibacron Blue F3GA».

Иногда в их торговых названиях фигурирует просто цвет красителя, например «Blue Sepharose CL-6B» (фирма «Pharmacia»). Фирмы «Pierce» и «Amicon», кроме сорбента на основе «Cibacron Blue», выпускают также агарозные аффинные сорбенты с красным красителем «Procion Red HE3B», специфическое отличие которого было отмечено выше. Фирма «Pharmacia» выпускает такой сорбент под наименованием «Red Sepharose CL-6B». Фирма «Amicon» присвоила двум своим сорбентам на основе проционовых красителей названия «Matrex Gel Blue A» и «Matrex Gel Red A».

Следует обратить внимание читателя на замечание Вебера и соавторов по поводу того, что в продажных препаратах красителей иногда встречаются примеси, которые могут инактивировать определенные ферменты. Они описывают метод хроматографической очистки красителя на колонке силикагеля в органическом растворителе [Weber et al., 1979b]. Сдругой стороны, отмечен случай, когда после взаимодействия с голубой агарозой весьма лабильный фермент (один из изоферментов глицерин-3-фосфатдегидрогеназы из сердца человека) приобрел термоустойчивость, по-видимому, также за счет связывания с какой-то стабилизирующей его структуру примесью [Mc Ginnis, 1983].

В заключение упомянем оригинальный вариант использования красителя «Cibacron Blue» в процедуре, которую можно назвать «аффинным двухфазным распределением». Краситель легко связать химически с полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000), так что он сохраняет свое сродство к некоторым ферментам. Модифицированный красителем ПЭГ используют в двухфазной системе распределения ПЭГ—декстран. Очищаемые ферменты уходят в фазу полиэтиленгликоля, а все прочие белки оказываются в фазе декстрана. Разделив фазы, фермент снимают с красителя повышенной концентрацией фосфатного буфера. Эта процедура была использована для быстрой препаративной очистки фосфофруктокиназы из дрожжей [Kopperschläger, Johansson, 1982].

Лизин и полилизин

Фирма «Pharmacia» поставляет сорбент «Lysine-Sepharose 4B», в котором в качестве лиганда фигурирует закрепленный непосредственно на сефарозе через свою α -аминогруппу лизин. Этот сорбент представляет собой амфотерный обменник, несущий ионогенные группы обоих знаков, определенным образом взаимно ориентированные в пространстве. По неясным причинам такой обменник обладает довольно разнообразной групповой специфичностью: с его помощью, с одной стороны, можно вести очистку плазминогена и тромбина, а с другой — хроматографическое разделение рибосомных РНК и очистку двунитевой ДНК (напомним, что гистоны, обладающие выраженным сродством к ДНК, богаты лизином). Плазминоген элюируют с сорбента с помощью ϵ -аминомасляной кислоты, которая, по-видимому, выступает в качестве конкурирующего лиганда, а нуклеиновые кислоты — увеличением концентрации NaCl, что свидетельствует в пользу ионного характера их связи с остатками лизина.

Фирма «PL-biochemicals», помимо лизин-агарозы, выпускает еще и полилизин-агарозу. В этом случае полилизин связывается с агарозой в нескольких точках по своим боковым аминок группам, оставляя большую их часть свободными, например для связывания по ним других (вторичных) лигандов. Сорбент с закрепленным на нем полилизином поставляют и фирма «Pierce».

Лиганды для протеаз

Фирма «Pierce» предлагает несколько готовых аффинных сорбентов для этой цели. В качестве лигандов здесь фигурируют аминокислоты (аргинин, триптофан, аланилаланилаланин), аналоги субстратов (глицилтирозилазобензилянтарная кислота), синтетические и природные ингибиторы трипсина и химотрипсина, ингибитор кислых протеаз, пепстатин и др. В. М. Степанов и соавторы показали, что циклопептидный антибиотик бацитрацин может быть использован в качестве аффинного лиганда для широкого спектра протеиназ разных классов из различных организмов. Авторы указывают также на то обстоятельство, что агароза — не всегда наиболее удачная матрица для очистки протеиназ, так как ее разрушают часто сопутствующие протеазам карбогидразы. Выше был рассмотрен предложенный ими синтез сорбента для очистки протеаз на основе крупнопористого силикагеля [Stepanov et al., 1981].

Гепарин

Кислый аминополисахарид гепарин ($M > 10\,000$) известен в качестве антикоагулянта крови. Кроме того, он применяется в биохимии как ингибитор рибонуклеаз. Это его качество, по-видимому, отражает некоторое сходство полимера, содержащего две-три сульфогруппы на каждую дисахаридную структурную единицу, с РНК. Две эти особенности определили использование гепарина в качестве лиганда для аффинной хроматографии факторов коагуляции крови и (особенно широко) для очистки белков, взаимодействующих и нуклеиновыми кислотами (полимераз, обратной транскриптазы, рестриктаз, факторов инициации и элонгации белкового синтеза и др.). Кроме того, иммобилизованный гепарин связывает липопротеид-липазы и некоторые липопротеиды. Гепарин-агароза выпускается всеми упомянутыми фирмами-поставщиками аффинных сорбентов, кроме «Bio-Rad».

Нуклеиновые кислоты

Естественно, что еще более эффективную, чем с гепарином, и избирательную очистку белков метаболизма и регуляции матричной активности можно получить, используя в качестве лигандов сами нуклеиновые кислоты. Аффинные сорбенты с иммобилизованными НК могут обладать не только групповой (белки хроматина, нуклеазы, рестриктазы и др.), но и сугубо индивидуальной специфично-

стью, например для связывания продуктов транскрипции определенного гена или специфических регуляторов его матричной активности. Кроме того, на отобранных путем клонирования и иммобилизованных фрагментах ДНК можно за счет комплементарного взаимодействия очищать соответствующие мРНК. Возможно и обратное: очищать матричные участки нитей ДНК на иммобилизованных молекулах индивидуальных мРНК. Разнообразные способы ковалентного и нековалентного закрепления ДНК и РНК на матрицах агарозы и целлюлозы рассмотрены ниже. Для приготовления аффинного сорбента с индивидуальной специфичностью, естественно, этими способами приходится воспользоваться самому экспериментатору. Для применения в качестве сорбентов с групповой специфичностью фирма «PL-biochemicals» поставляет сорбенты на основе как агарозы, так и целлюлозы с иммобилизованной (нековалентно) денатурированной или нативной ДНК из тимуса теленка.

Полиуридиловая кислота

Большинство молекул мРНК любого происхождения содержит на своем 3'-конце более или менее протяженную полиадениловую последовательность (средняя длина — около 100 адениловых остатков). Это обстоятельство дало возможность создать аффинный сорбент с групповой специфичностью к любой молекуле мРНК, содержащей такую последовательность. На матрице агарозы ковалентно закрепляют комплементарный синтетический гомополимер поли(U) длиной около 100 остатков. Его прочно фиксируют на BrCN-активированной сефарозе во многих точках по длине полимера через таутомерные енольные формы остатков урацила. Концентрация поли(U) в продажном препарате «Poly(U)-Sephарозе 4В» фирмы «Pharmacia» составляет 0,5 мг на 1 мл набухшего геля. Для средних по размерам мРНК животного происхождения это обеспечивает емкость сорбента около 150 мкг мРНК на 1 мл геля.

Фирма «PL-biochemicals», помимо аналогичных, производит еще и поли(U)-агарозные сорбенты с повышенным содержанием поли(U) — от 2 до 4 мг на 1 мл агарозы. Такие сорбенты применяются в основном для очистки мРНК из суммарных препаратов РНК цитозоля или полисом, где относительное их содержание составляет около 3%.

Связь лиганда с поли(А)-мРНК осуществляется, естественно, за счет водородных связей между основаниями двух комплементарных последовательностей — поли(U) и поли(А). На прочность этой связи влияет наличие в жидкой фазе солей, катионы которых нейтрализуют заряды остатков фосфорной кислоты в обеих последовательностях. Важную роль играют также температура среды и присутствие в ней агентов, разрывающих водородные связи, например формамида. Все это позволяет гибко варьировать условия связывания мРНК с сорбентом и ее элюции в целях подавления неспецифической сорбции РНК других типов. В этом отношении поли(U)-агароза имеет преимущество перед аналогичным сорбентом на базе целлюлозы — олиго(dT)-целлюлозой, заметно более склонной к неспеци-

фической сорбции. Второе преимущество поли(U)-агарозы — значительная длина цепи поли(U), что обеспечивает связывание молекул мРНК с относительно короткой (в несколько адениловых остатков) поли(А)-последовательностью. Впрочем, у олиго(dT)-целлюлозы есть и свои достоинства, отмеченные ниже.

Кроме поли(А)-мРНК, на поли(U)-агарозе удастся сорбировать и очищать обратную транскриптазу и интерферон. В этом случае специфическое взаимодействие белка с поли(U)-последовательностью осуществляется не за счет водородных связей, а по-видимому, за счет взаимодействия понов, так как элюцию удается осуществить с помощью высокой концентрации соли (при элюции мРНК соль из элюента удаляют). Следует помнить, что поли(U) атакуется рибонуклеазой, которую необходимо удалить или блокировать в препаратах, вносимых на поли(U)-сефарозу.

Полиадениловая кислота

Повышенный интерес исследователей к функционированию мРНК распространяется и на выяснение физиологической роли ее поли(А)-последовательности. Естественно ожидать, что поли(А) как-то участвует во взаимодействиях с белками, регулирующими функционирование мРНК. В интересах исследования этой проблемы был разработан аффинный сорбент, имитирующий поли(А)-участок мРНК. Фирма «Pharmacia» выпускает его под названием «Poly(A)-Sepharose 4B». Как и в предыдущем случае, здесь цепь полиадениловой кислоты длиной около 100 нуклеотидов ковалентно (через N⁶-аминогруппы) во многих точках фиксирована на BrCN-активированной сефарозе. Концентрация поли(А) составляет 0,25 мг на 1 мл набухшего геля. Примерно такую же емкость имеют аналогичные сорбенты фирмы «PL-biochemicals», а поли(А)-агароза фирмы «Sigma» отличается повышенным содержанием полинуклеотида (2 или 4 мг/мл).

Помимо очистки и фракционирования белков, связывающих мРНК, поли(А)-сефароза нашла себе применение для выделения некоторых ядерных и вирусных РНК, несущих в своем составе достаточно протяженные поли(U)-участки. Функции этих участков пока не вполне понятны. С аналогичной целью были разработаны и поставляются в готовом виде (фирмы «PL-biochemicals», «Sigma») сходные аффинные сорбенты с другими иммобилизованными полирибонуклеотидами: поли(С)-, поли(Г)-, поли(І)-агарозы и даже сорбент смешанного типа — поли(І)-поли(С)-агароза.

Олигодезокситимидиловая кислота

— аффинных сорбентах этого типа относительно короткие цепи олигодезокситимидиловой кислоты (10—20 нуклеотидных остатков) ковалентно закреплены через концевой 5'-фосфат на матрице волокнистой целлюлозы. Основное назначение их — такое же, как поли(U)-агарозы, т. е. очистка поли(А)-мРНК, однако физико-химические ха-

характеристики двух сорбентов заметно различаются. Емкость олиго(dT)-целлюлозы по отношению к мРНК на порядок выше, чем у поли(U)-агарозы, так как на единице поверхности целлюлозы размещается большее число коротких и закрепленных только в одной точке нитей олигонуклеотида. Лиганд олиго(dT) в отличие от поли(U) не подвержен атаке рибонуклеаз, примеси которых почти неизбежно присутствуют в препаратах очищаемых РНК. К числу недостатков олиго(dT)-целлюлозы, как уже отмечалось, относится более высокий уровень неспецифической сорбции и плохое связывание молекул мРНК с короткими полиадениловыми последовательностями.

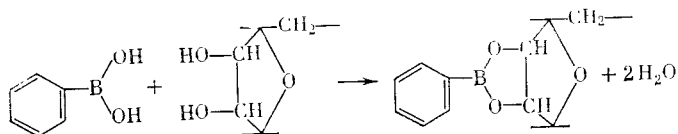
Помимо очистки мРНК и белков, связывающихся с ДНК, для олиго(dT)-целлюлозы в последние годы открылась новая важная область применения — в качестве матрицы и затравки для полимераз и обратных транскриптаз, ведущих соответствующие комплементарные синтезы нуклеиновых кислот *in vitro*.

Чаще других сегодня используются сорбенты типа «Oligo (dT)-cellulose» фирмы «Collaborative Research». Из трех типов сорбентов этого типа (T1, T2 и T3) наибольшей популярностью для очистки мРНК пользуется T3, характеризующийся меньшим уровнем неспецифической сорбции при более высокой, чем у других типов, емкости. Для очистки обратной транскриптазы и в качестве затравки для матричного синтеза удобен тип T1, олигонуклеотидные цепи которого, относительно коротки (12—18 звеньев). Несколько типов олиго(dT)-целлюлозы предлагает фирма «PL-biochemicals».

Для решения тех же задач, что были отмечены в конце предыдущего раздела, обе фирмы выпускают сорбенты на основе целлюлозы, включающие в качестве лигандов остальные олигодезоксирибонуклеотиды: олиго(dA), олиго(dC), олиго(dG) и олиго(dI).

Борная кислота

Использование остатка фенолборной кислоты в качестве лиганда для аффинной хроматографии молекул, содержащих свободную *цис*-диольную группу рибозы, в последнее время приобретает все большую популярность. Два гидроксила фенолборной кислоты охотно взаимодействуют с *цис*-диольной группой, образуя комплекс по следующей схеме:



Комплекс легко расщепляется в слабокислой среде, а также под действием конкурирующих диолов — этиленгликоля и 1,3-пропандиола. Путем закрепления фенолборной кислоты на матрице можно получить аффинный сорбент, с помощью которого РНК с незамещенной по 2-му и 3-му гидроксилам концевой рибозой легко отделить от

РНК, в которых один из концевых гидроксильных замещен (например, тРНК от аминоксил-тРНК), а также от ДНК.

Описан способ присоединения *m*-аминофенилборной кислоты к аминоксилцеллюлозе через гидрофильный спейсер [Gelinas, Roberts, 1977]. Соответствующий сорбент поставляется фирмой «Collaborative Research» под торговым наименованием «DBAE-cellulose» («dihydroxyborylaminoethyl-cellulose»). Он содержит некоторое количество незамещенных аминоксил, что обуславливает свойства слабого анионообменника. В ряде случаев это нежелательно (из-за возможности неспецифической сорбции РНК), и фирма одновременно предлагает сорбент под наименованием «Acetylated DBAE-cellulose», у которого свободные аминоксилы аминоксилцеллюлозы почти полностью алкилированы с помощью уксусного ангидрида.

Другие фирмы («PL-biochemicals», «Bio-Rad», «Pierce») выпускают аналогичные аффинные сорбенты на основе полиакриламида. В этом случае не возникает проблем с анионообменными свойствами, но использование таких сорбентов для очистки нуклеиновых кислот ограничено меньшим размером пор. Недавно было описано получение фенилборильных сорбентов на основе агарозы. Авторы вели конденсацию *m*-аминофенилборной кислоты с продажным препаратом карбоксиметилсефарозы [B. Pace, N. Pace, 1980]. Однако, судя по их данным, им не удалось надежно избавиться от неспецифической сорбции — на этот раз, по-видимому, за счет незамещенных карбоксильных групп исходного ионообменника.

Вилк и соавторы описали интересное применение такого сорбента для выделения и очистки ядерных РНК, несущих «кэп», т. е. последовательность вида $m^7GpppNmp...$ на 5'-конце. Кэп обеспечивает как наличие *цис*-диольной группировки концевой рибозы, так и положительный заряд на 5'-конце молекулы РНК за счет m^7G . В щелочной среде ($pH > 8$) остаток борной кислоты сорбента образует тетраэдрическую структуру, несущую отрицательный заряд. Электростатическое притяжение зарядов способствует взаимодействию рибозы с лигандом и укрепляет эфирную связь, возникающую между ними. Эти явления и обуславливают избирательное сродство сорбента к РНК, несущим кэп [Wilk et al., 1982].

Недавно фирма «Pierce» начала выпуск аффинного сорбента для очистки гликопротеидов под названием «Glyco-Gel B», в котором борная кислота закреплена непосредственно на матрице 6%-ной агарозы.

Приведенная выше реакция присоединения рибозы к фенилборильным обменникам успешно идет при слегка щелочных значениях pH (8—8,5). Для отделения аминоксиллированной тРНК от неаминоксиллированных молекул с целью очистки индивидуальных тРНК эти условия неблагоприятны, так как стимулируют деаминоксиллирование тРНК. Джонсон присоединял нитрогруппу к фенильному кольцу в *орто*- и *пара*-положениях по отношению к диоксидоборилу. Это приводило к снижению *pK* остатка борной кислоты, и реакция присоединения рибозы успешно протекала при pH 7. Им описан синтез нитробензилборил-замещенного полиакриламидного сорбента на основе продажной матрицы аминоксиллакриламида [Johnson, 1981].

Приведенный перечень наиболее часто употребляемых продажных лигандов с групповой специфичностью, которые нам казалось необходимым хотя бы вкратце охарактеризовать, далеко не исчерпывает всего их многообразия. Сюда не вошли, например, аминокислоты, различные сахара и аминоксахара, производные хелевой кислоты, спермин, протамин, гистон, биотин и авидин, ингибиторы трипсина, апротинин, желатин и др. В этот перечень не были включены и ионообменные сорбенты для «ковалентной» хроматографии, в которой используется образование временных связей между лигандом и веществом. Такие сорбенты будут рассмотрены отдельно.

Особый вариант аффинной хроматографии связан с использованием хелатных сорбентов. На матрице закрепляют хелирующий агент, затем путем пропускания раствора соответствующей соли колонку «заряжают» ионами Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{3+} и др. На этих ионах при хроматографии задерживаются белки, способные образовывать с ними комплексы. Элюцию можно осуществлять снижением pH буфера до 4—5 или введением в него ЭДТА. Фирма «Pharmacia» для хелатной аффинной хроматографии выпускает специальный сорбент «Chelating Sepharose 6B».

Недавно Порат и Олин описали синтез двух очень эффективных хелатных сорбентов. Первый из них — иминодиацетатсепхароза («IDA-Sepharose 6B») — способен фиксировать металл тремя координационными связями, а второй — трис(карбоксиметил)этилендиаминсепхароза («TED-Sepharose 4B») — пятью. Элюцию белков с этих сорбентов можно осуществлять растворами аминокислот (или их аналогов) — по-видимому, тех, которые взаимодействуют с металлом в составе белка. В работе приведены примеры очистки некоторых белков плазмы на колонках с хелированным никелем и железом [Porath, Olin, 1983]. Известно, что координационные связи белка с металлом усиливаются в присутствии высоких концентраций NaCl (до 5 М), что облегчает борьбу с неспецифической адсорбцией белков. Такой же эффект дает присутствие в растворе этиленгликоля или диметилсульфоксида. Это обстоятельство можно учесть при работе с гидрофобными белками.†

ПОСАДКА ЛИГАНДОВ НА АКТИВИРОВАННЫЕ МАТРИЦЫ

При создании сорбентов с индивидуальной специфичностью, а также в тех случаях, когда продажные сорбенты с групповой специфичностью по своим характеристикам не соответствуют задачам эксперимента, исследователю приходится самому осуществлять посадку выбранного лиганда на матрицу.

Выше, при рассмотрении методов активации матриц, были вкратце описаны способы посадки лигандов на матрицы, активированные трихлортриазинном, бензохиноном и трезилхлоридом. Здесь мы приведем несколько более подробные и иллюстрированные типичными примерами описания способов посадки лигандов на широко

используемые готовые активированные матрицы. Разумеется, эти же способы применимы и в тех случаях, когда соответственно активированные матрицы приготовлены в лабораторных условиях.

BrCN-активированная агароза

Фирма «Pharmacia» рекомендует следующую стандартную процедуру для своей активированной матрицы «CNBr-activated Sepharose 4B». Этот сорбент поставляется в виде лиофилизированного порошка, 1 г которого дает 3,5 мл набухшего геля (порошок следует хранить на холоду). Сорбент замачивают в течение 15 мин в 1 мМ HCl и промывают порциями того же раствора от консервирующих добавок на стеклянном фильтре из расчета 200 мл на 1 г сухого порошка. Белок или иной какой-либо лиганд растворяют в 0,1 М NaHCO_3 -буфере (pH 8,3), содержащем 0,5 М NaCl, из расчета 5—10 мг белка или 1—10 мкмоль низкомолекулярного лиганда на 1 мл влажного геля при соотношении объемов буфера и геля около 2 : 1. Вместо бикарбонатного можно использовать и любой другой буфер, не содержащий первичных аминогрупп. При концентрации белка около 5 мг на 1 мл геля до 90 % его может связаться с сорбентом (количество связавшегося белка можно определить после лиофилизации сорбента и полного гидролиза его в 6 н. HCl при 110° за 24 ч; коричневую суспензию фильтруют через миллипоровый фильтр и определяют в ней содержание аминокислот обычными способами).

С увеличением исходной концентрации белкового лиганда абсолютное количество связавшегося материала медленно увеличивается, но доля связывания снижается ввиду стерических помех, которые создают друг для друга крупные молекулы белка при связывании с близко расположенными активными центрами матрицы. Кроме того, излишне высокая исходная концентрация лиганда стимулирует повышенный уровень неспецифической сорбции, что снижает избирательность сорбента.

После того как растворение лиганда закончено, тем же буфером быстро промывают расчетное количество активированной сефарозы, вносят ее в стакан с раствором лиганда и осторожно перемешивают механической мешалкой в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи на холоду. К этой простой операции нам придется сделать довольно подробный комментарий.

Было упомянуто, что промывать сорбент буфером лиганда следует быстро. Дело в том, что при pH 8,3 идет постепенный гидролиз активных групп сорбента и за 4 ч его связывающая способность снижается в 2—3 раза. Выбор pH буфера для посадки лиганда зависит от того, каким образом ее предполагается осуществить. Напомним, что нуклеофильную атаку на активированные группы матрицы (в данном случае на имидокарбонатную группу) могут вести лишь непротонированные (незаряженные) аминогруппы. Слабощелочной буфер с pH 8,3 может обеспечить достаточное количество незаряженных концевых аминогрупп белка ($pK \approx 8$), по которым и будет идти его посадка на матрицу, но для посадки по ϵ -аминогруппе лизина

($pK \approx 10$) приходится использовать сильнощелочной буфер (в котором инактивация сорбента идет еще быстрее). С другой стороны, посадку лиганда по ароматическим аминам ($pK \approx 5$) можно осуществлять и в нейтральной среде.

Иногда частичный гидролиз и снижение активности сорбента допускают преднамеренно, например выдерживая его в щелочной среде в течение выбранного опытным путем времени. Такая операция может оказаться необходимой, если в результате связывания в нескольких точках лабильный белковый лиганд денатурируется и утрачивает свою биологическую активность. Поскольку гидролиз активных групп матрицы идет статистически, он приводит к уменьшению плотности распределения оставшихся активными групп по объему геля. Если же связывание лиганда с матрицей в нескольких точках не ведет к снижению его биологической активности, то оно может быть даже полезным, так как уменьшает опасность снятия, или, как говорят, «подтекания» лиганда с сорбента.

Следует заметить, что биологическая активность лигандов, связанных даже в одной точке, значительно меньше, чем в растворе. Это может быть обусловлено, кроме самого факта закрепления, еще и микроокружением лиганда — природой и близостью расположения поверхности матрицы или спейсера. Разумеется, на активность лиганда могут влиять и примеси, входящие в состав исходного очищаемого препарата (протеиназы, нуклеазы, ионы тяжелых металлов и др.).

Довольно высокая концентрация соли, которую рекомендуется вводить в буфер для связывания лиганда (0,5 М), нужна для блокирования неспецифической сорбции ионного характера, которая свойственна BrCN-активированной агарозе. Напомним, что лиганд связывается с матрицей через остаток изомочевины, который относительно легко протонируется с появлением положительного заряда на присоединенном двойной связи атоме азота [Schnaar et al., 1977].

Теперь можно вернуться к процедуре посадки лиганда на матрицу. После окончания инкубации необходимо блокировать не использованные в реакции с лигандом активные группы матрицы. Для этого сорбент переносят в 1 М раствор этаноламина или 0,2 М раствор глицина при pH 8 и снова перемешивают, как при посадке лиганда. Наконец, для удаления избытков лиганда и блокирующих агентов гель промывают на воронке 4—5 раз попеременно кислым и щелочным буферами, например 0,1 М Na-ацетатным (pH 4) и буфером, используемым для посадки лиганда, добавляя в оба буфера до 0,5 М NaCl. Чередование pH при промывке способствует десорбции неспецифически сорбированного на матрице материала. Промытый аффинный сорбент переводят в буфер для хроматографии и хранят на холоду.

Рекомендации фирмы «IBF» для посадки лигандов на BrCN-активированные агарозу («Ultrogel A») и смешанный агарозно-полиакриламидный гель («Ultrogel AcA») в основном совпадают с рекомендациями фирмы «Pharmacia», за исключением значительно более высокой исходной концентрации низкомолекулярных лигандов (0,3—

0,7 ммоль на 1 мл геля). Возможно, что это обусловлено значительно меньшей плотностью распределения активных групп в матрицах типа «Ultrogel AcA», поскольку активация бромцаном идет только по агарозной компоненте этих гелей.

Если стоит задача посадки на матрицу не очень хорошо растворимых в воде лигандов, то описанную реакцию можно проводить в 50%-ном растворе этиленгликоля или диметилформамида. Во избежание последующей конкуренции за вещество очень важно осуществить надежную отмывку всего не связавшегося с матрицей лиганда. Если возможно, то для этой цели вводят промывку 6 М раствором гуанидинхлорида.

Приведем теперь несколько типичных примеров.

Дэвисон и соавторы активировали бромцаном агарозную матрицу A-15т фирмы «Bio-Rad» (реакцию вели в 2 М Na_2CO_3 , используя раствор BrCN в ацетонитриле). 250 мл активированной агарозы переносили в пластмассовый сосуд, где в 250 мл 0,2 М NaHCO_3 -буфера (pH 8,5) было растворено 3 г гепарина. Суспензию геля перемешивали во вращающемся встряхивателе в течение 4 ч при 20°, затем добавляли глицин до 1 М и перемешивали еще 4 ч. Далее гель последовательно промывали по 2 л следующих водных растворов: 0,1 М Na-ацетат (pH 4); 2 М мочевины, 0,1 М NaHCO_3 (pH 10); в каждом из них содержалось 0,5 М NaCl. Окончательно гель промывали водой. Полученный аффинный сорбент содержал 300 ± 50 мкг гепарина в 1 л влажного геля. Его хранили в 0,02 М Трис-HCl (pH 8) с добавлением 0,02% азидата натрия в качестве бактериостатического агента [Davison et al., 1979].

Посадку кофермента А на BrCN-активированную сефарозу по его единственной аминогруппе остатка аденина [Chibata et al., 1974] вели в слегка кислом буфере. 25 г активированной в лаборатории 6%-ной сефарозы вносили в 92 мл раствора восстановленного КоА (0,5 мг/мл) в 0,1 М Na-ацетатном буфере (pH 6), осторожно перемешивали 6 ч при 25°, затем промывали на фильтре 100 мл 1 М NaCl, 100 мл 1%-ного раствора β-меркаптоэтанола (для гарантии сохранения восстановленной формы кофермента) и снова буфером до полного вымывания несвязанного кофермента (до отрицательного теста на нитропруссидную реакцию). При использовании исходного раствора чистого КоА неспецифическая сорбция маловероятна, чем и объясняется отсутствие соли в буфере при посадке кофермента и упрощенный характер промывки готового сорбента.

Рейес и Сэндквист готовили аффинный сорбент, содержащий краситель «Cibacron Blue F3GA», используя для этой цели продажный препарат голубого декстрана фирмы «Pharmacia», в котором краситель связан с декстраном через остаток триазинтрихлорида. 15 г BrCN-активированной сефарозы вымачивали 20 мин в 1 М HCl и промывали 10 раз по 300 мл того же раствора на стеклянном фильтре. Затем гель вносили в 50 мл 0,4 М Na_2CO_3 (pH 10), где был предварительно растворен 1 г голубого декстрана, перемешивали 2 ч при комнатной температуре, затем отмывали избыток декстрана на фильтре и для блокирования свободных активных групп имидокарбоната переносили гель в 0,2 М Трис-HCl (pH 8), где перемешивали 2 ч с одной сменой буфера. Наконец, сорбент обильно промывали 1 М NaCl и хранили на холоду в 0,01 М Трис-HCl (pH 8) с добавлением 0,02% NaN_3 [Reyes, Sandquist, 1978].

Приготовление иммуноаффинных сорбентов на основе BrCN-активированной агарозы практикуется чрезвычайно широко. В качестве недавнего примера процитируем методику приготовления иммуносорбента для очистки рецептора инсулина из плаценты человека [Harrison, Itin, 1980].

Предварительно очищенный IgG от нормальных доноров и гаптенств с инсулиноустойчивым диабетом (в их крови содержатся антитела к рецептору инсулина) растворяли до концентрации 2,5 мг/мл в 0,1 М NaHCO_3 -буфере

(рН 9), содержащем 0,5 М NaCl. 1 г активированной сефарозы промывали 200 мл 1 М HCl и добавляли к 14 мл соответствующего раствора IgG. Суспензию встряхивали 2 ч при 24°, а затем еще 16 ч на холоду. Сорбент собирали низкоскоростным центрифугированием, инкубировали еще 2 ч при 24° в 1 М растворе этаноламина (блокировка) и промывали попеременно пятью сменами 0,1 М Na-ацетатного (рН 4) и 0,1 М Na-боратного (рН 8,5) буферов с добавлением в каждый до 0,5 М NaCl. Затем сорбент промывали и хранили в 0,05 М HEPES-буфере (рН 7,6), содержащем 0,1% Тритона X-100 и 1 мМ Na₂S.

С помощью добавленного в следовых количествах радиоактивно меченного IgG эффективности посадки IgG оценили в 60%. Использование сорбента в опытах с применением конкурентного радиоиммунного метода (КРИМ; см. [Остерман, 1983]) показало, что при посадке на сефарозу сохраняется около 35% активности такого же количества IgG в растворе.

Описана посадка на BrCN-активированную сефарозу в качестве спейсера аминокaproновой кислоты [Nishikawa, Bailon, 1975].

Мы столь подробно разобрали и проиллюстрировали методику использования BrCN-активированной сефарозы, потому что этот вариант приготовления аффинных сорбентов в настоящее время пользуется наибольшей популярностью. Теперь рассмотрим (менее детально) способы использования других готовых активированных матриц.

Эпокси-активированная сефароза (оксиран-сефароза)

Фирма «Pharmacia» поставляет этот сорбент также в виде лиофилизированного порошка с защитными добавками, в упаковках по 15 г, что соответствует примерно 50 мл набухшего геля. Концентрация оксирановых групп составляет 15—20 мкэкв на 1 мл геля. Порошок может храниться на холоду до года с незначительным снижением активности.

Фирма рекомендует следующую стандартную процедуру посадки лиганда на сорбент. Нужное количество порошка замачивают и промывают на стеклянном фильтре водой (не менее 100 мл/г). Лиганд растворяют в воде, водном буфере (карбонатном, боратном или фосфатном; буферы, содержащие нуклеофильные группы, непригодны) с рН 8,5—11 или, если это необходимо для растворения лиганда, в 50%-ном водном растворе диметилформамида или диоксана; рН можно доводить с помощью NaOH. Скорость протекания реакции увеличивается с ростом рН вплоть до 13, так что степень защелачивания буфера следует выбирать исходя из устойчивости лиганда (устойчивость сефарозы повышена благодаря сшивке бисоксипраном). При этом следует иметь в виду, что гидролиз эпоксидных групп несколько ускоряется при сильном сдвиге рН в щелочную сторону. Концентрацию лиганда для аналогичного геля фирма «IBF» рекомендует выбирать из расчета 0,5—1 ммоль низкомолекулярного лиганда или 5—10 мг макромолекулярного на 1 мл геля. Инкубацию с осторожным, как обычно, перемешиванием следует вести не менее 16 ч при температуре 25—40° (на водяной бане). Скорость реакции связывания увеличивается с повышением температуры вплоть до 70°.

Избыток лиганда удаляют промывкой тем же буфером (если надо, то с добавкой органического растворителя), водой и попеременно кислым и щелочным буферами (0,1 М Na-ацетатным, pH 4, и 0,1 М Na-боратным, pH 8) с добавлением NaCl до 0,5 М. Блокирование оставшихся свободными активных групп можно осуществить воздействием 1 М этаноламина в течение примерно 4 ч. Образующиеся эфирные и алкильные связи очень прочны. Сорбент может храниться длительное время на холоду в присутствии 0,02% азида натрия.

Эпокси-активированную сефарозу с большим успехом, чем BrCN-активированную, можно использовать для связывания полисахаридов и нуклеиновых кислот, поскольку эпоксигруппа активно присоединяется к лиганду эфирной связью по гидроксилам сахаров. В качестве примера можно привести уже цитировавшуюся работу [Uy, Wold, 1977], где путем посадки полисахаридов на эпокси-активированную сефарозу готовили аффинные сорбенты для очистки лектинов и гликозидаз (посадку полисахаридов в соотношении 100 мг на 1 г сорбента вели прямо в 0,1 н. растворе NaOH при 37° в течение 24 ч).

Активированная CN-сефароза 4В

Выше была приведена структура готового сорбента с шестиуглеродным спейсером, активированным по концевому карбоксилу эфирной связью с N-оксисукцинимидом; этот сорбент фирма «Pharmacia» выпускает под торговым названием «Activated CN-Sepharose 4В». Он поставляется в виде лиофилизированного порошка. При набухании 15 г порошка (стандартная упаковка) получается 45 мл геля. Промывают гель так же, как в предыдущем случае, 1 mM HCl при 0°. Посадку лиганда эффективно осуществляют в буферах, охватывающих широкий диапазон pH (5,5—10). При крайних значениях этого диапазона pH с сорбентом связывается еще около 80% от максимального количества лиганда, которое можно посадить при pH 8. Стандартная методика рекомендует использовать 0,1 М Na-бикарбонатный буфер (pH 8), содержащий 0,5 М NaCl. Если предпочтительно вести присоединение лиганда по концевым α -аминогруппам, а не по ϵ -аминогруппам лизина, то следует использовать кислый буфер. Как уже отмечалось, в нем α -аминогруппа протонирована в меньшей степени, чем ϵ -аминогруппа, а в реакцию вступают только непротонированные первичные аминогруппы. Концентрация лиганда должна быть в несколько раз больше, чем концентрация активных эфиров N-сукцинимида. Инкубацию лиганда с суспензией геля при механическом перемешивании ведут в течение 1 ч при комнатной температуре или 4 ч на холоду. Затем сорбент промывают буфером для посадки лиганда и, как обычно, 4—5 сменами кислого и щелочного буферов в присутствии 0,5 М NaCl. Промывка щелочным буфером (0,1 М Трис-HCl, pH 8) одновременно блокирует оставшиеся свободными активированные спейсеры. Для большей надежности их можно специально блокировать обработкой 1 М раствором этаноламина (pH 9).

Матрицы со спейсерами, оканчивающимися карбоксильной группой («СН-Sephарозе 4В», «АС-Ultrogel АсА 34»), можно активировать по этой группе с помощью N-оксисукцинимидов и в лабораторных условиях. Реакция активации идет в неводной среде. Например, «АС-Ultrogel АсА 34» необходимо сначала надежно перевести в чистый диоксан (конечное соотношение объемов геля и диоксана 1 : 1). Затем на 50 мл такой суспензии добавляют 600 мг N-оксисукцинимидов, перемешивают до полного его растворения и вносят 1 г дициклогексилкарбодиимида. Активация заканчивается после 2 ч инкубации с перемешиванием, после чего гель промывают обильно диоксаном, четыре раза равными объемами метанола и снова диоксаном (рекомендация фирмы «IBF»). Промывка метанолом удаляет производные мочевины, образующиеся в ходе активации. Активированный сорбент можно хранить в диоксане на холоду в темной бутылке. Перед использованием промывками на фильтре его переводят в буфер для посадки лиганда, как было описано выше (промывку 1 мМ HCl можно не производить, так как нет консервирующих добавок).

Активированные глютаральдегидом гели смешанного типа

Фирмы «IBF» и «LKB» поставляют эти активированные матрицы («Act-Ultrogel АсА 22» и «Act-Magnogel АсА 44») в виде суспензий в 1%-ном водном растворе глютаральдегида, что обеспечивает их стабильность. Содержание активных групп — 50—80 мкмоль в 1 мл упакованного геля, что позволяет связать с сорбентом 2—4 мг/мл иммуноглобулинов.

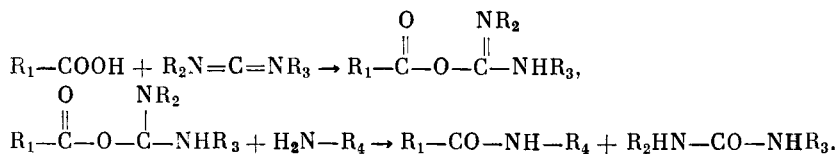
Как уже отмечалось, активация глютаральдегидом одновременно создает достаточно протяженный гидрофильный спейсер, поэтому такие гели особенно удобны для посадки белковых лигандов, в частности ферментов, тем более что посадку можно вести в мягких условиях — при близких к нейтральным значениям pH.

Фирма «IBF» рекомендует следующие стандартные условия для такой посадки. Активированный гель уравнивают 0,5 М фосфатным буфером (pH 7,6) и вносят в раствор белка в том же буфере из расчета 5—10 мг белка на 1 мл геля. Можно использовать и другие буферы, не содержащие первичных аминов, с pH в интервале 6,9—8,5. Инкубацию проводят с перемешиванием при 4° в течение 18 ч. Если биологическая устойчивость лиганда это допускает, инкубацию можно вести и при комнатной температуре, сократив ее продолжительность. Излишек лиганда отмывают на фильтре 8—10 объемами того же буфера. Затем осуществляют блокировку незанятых активных групп 0,1 М раствором забуференного (pH 7,5—8,5) этаноламина в течение 3 ч при 4°; можно использовать также растворы Триса, глицина, DL-лизина и др. Гель снова промывают 8—10 объемами того же буфера с добавлением до 0,15 М NaCl, потом уравнивают буфером для аффинной хроматографии и хранят в суспензии на холоду с добавкой 0,02% мертиолатов или азидов натрия.

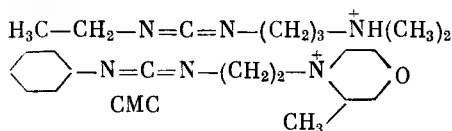
ПОСАДКА ЛИГАНДОВ НА СПЕЙСЕРЫ С ПОМОЩЬЮ КОНДЕНСИРУЮЩИХ АГЕНТОВ

Карбодиимиды

Свободная концевая карбоксильная группа спейсера может образовать прочную пептидную связь со свободной аминогруппой лиганда (и наоборот, концевая аминогруппа спейсера с карбоксилем лиганда) с помощью карбодиимида, катализирующего эту реакцию путем образования промежуточного активного эфира с партнером, несущим карбоксил. Затем аминогруппа второго партнера вытесняет остаток карбодиимида в виде производного мочевины, а сама образует пептидную связь по карбонилу первого партнера:



Здесь R_1 может обозначать спейсер, а R_4 — лиганд или наоборот. Реакция протекает в кислой среде. От характера NN' -заместителей карбодиимида зависит его растворимость. Посадку лигандов на неактивированные спейсеры ведут в водной среде, для чего пользуются водорастворимыми карбодиимидами. Из них чаще всего используют следующие два: N -этил- N' -(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (EDC) или N -циклогексил- N' -2-(4-метилморфолин)-этилкарбодиимид (СМС):



Контрионами для них служат соответственно Cl^- и анионы n -толуолсульфокислоты. По данным фирмы «Pharmacia», использование EDC дает более высокую степень связывания, чем СМС. Карбодиимид вводят в реакционную смесь с большим избытком — в концентрации около 0,1 М.

Фирма «Pharmacia» рекомендует следующую стандартную процедуру. Порошку «АН-Sephарозе 4В» или «СН-Sephарозе 4В» дают набухнуть в течение 15 мин в 0,5 М NaCl и промывают тем же раствором на фильтре от консервирующих добавок (200 мл/г); 1 г порошка дает 4 мл набухшего геля. Его переводят в подкисленную до pH 4,5 воду. В такой же воде растворяют карбодиимид из расчета 10 мг на 1 мл геля и избыток лиганда. Раствор лиганда смешивают с гелем (2 : 1), затем по каплям добавляют раствор карбодиимида. Суспензию перемешивают на качалке при комнатной температуре в течение ночи. Вначале pH смеси уменьшается и ее следует подтитровать NaOH . Избыток лиганда, непрореагировавший карбодиимид

таком соотношении концентраций EEDQ и лиганд оказываются в большом избытке по отношению к молекулам спейсера. Как правило, нет нужды вводить буферы, если только сами лиганды при растворении не слишком сильно закисляют или защелачивают водный раствор (сильнокислая среда разрушает EEDQ, а сильнощелочная — промежуточный ангидрид). При необходимости раствор подтитровывают до pH 5 или используют буфер, не содержащий первичных аминов, карбоксильных или фосфатных групп, которые могут реагировать с EEDQ.

Реакция конденсации идет при комнатной температуре с перемешиванием суспензии в течение ночи. По окончании ее сорбент обильно промывают 50%-ным этанолом, 3—4 объемами 1 M NaCl и, наконец, деионизованной водой. Блокировать оставшиеся свободными спейсеры нет нужды; впрочем, это можно сделать так же, как при использовании карбодиимида. Хранят сорбент уравновешенным буфером для аффинной хроматографии на холоду, с добавкой бактериостатического агента.

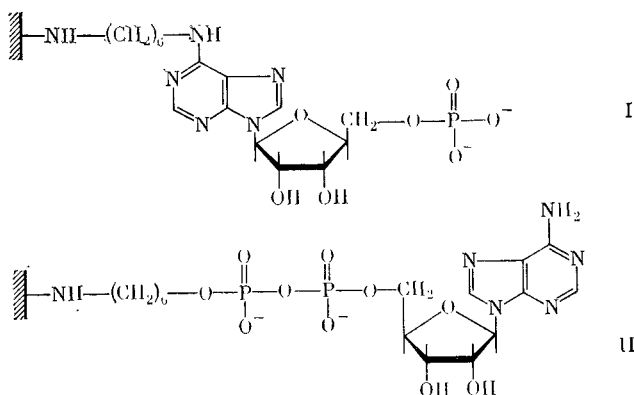
Мы рассмотрели все практически важные случаи посадки лигандов на активированные матрицы и спейсеры, а также на неактивированные спейсеры с помощью конденсирующих агентов. Легко видеть, что все рецепты построены по одной и той же схеме. Набухшую и промытую от консервирующих добавок матрицу смешивают в виде густой суспензии с большим избытком лиганда (и конденсирующего агента) в буфере или среде, обеспечивающей необходимое для реакции значение pH, иногда с добавлением соли для уменьшения неспецифической сорбции. Используемые буферы не должны содержать нуклеофильных групп, способных конкурировать с лигандом, или групп, которые бы могли взаимодействовать с конденсирующим агентом. Если это необходимо для растворения лиганда, можно использовать водно-органические растворители. Реакцию ведут с осторожным перемешиванием суспензии на холоду или при комнатной температуре в зависимости от лабильности лиганда, а при использовании эпокси-активированной матрицы (если это допускает лиганд) — и при повышенной температуре. Продолжительность реакции зависит от активности матрицы и температуры, варьируя в интервале 2—18 ч. Затем следуют удаление избытка растворенных реагентов промывкой растворителем для посадки лиганда и снятие с сорбента неспецифически сорбированного материала чередующимися промывками кислым и щелочным буферами с добавкой соли. Оставшиеся свободными активные электрофильные группы матрицы блокируют инкубацией с большим избытком нуклеофильных веществ (этанолamina, глицина, Триса и др.), которые потом отмывают буфером.

ХАРАКТЕР ЗАКРЕПЛЕНИЯ ЛИГАНДА НА МАТРИЦЕ

Проведенное рассмотрение способов посадки лигандов на матрицы необходимо дополнить двумя замечаниями менее конкретного характера, которые необходимо иметь в виду при отработке методики син-

теза аффинного сорбента для решения определенной экспериментальной задачи.

Оба они относятся к выбору и числу точек закрепления молекулы лиганда на матрице с позиций сохранения ее биологической активности — аффинного сродства к субстрату. Для низкомолекулярных лигандов известной структуры, фиксируемых заведомо в одной точке, речь может идти лишь о выборе этой точки, т. е. соответствующей функциональной группы. Поясним это конкретным примером. Аденозинмонофосфат и соответствующий дифосфат в растворе одинаково хорошо связываются со всеми перечисленными ниже ферментами, субстратами которых они являются. Однако после иммобилизации на матрице появляется избирательность, обусловленная выбором точки закрепления лиганда. В этом плане сопоставляли поведение двух снабженных спейсерами аффинных сорбентов — N⁶-(6-аминогексил)-5'-АМФ-сефарозы (I) и P¹-(6-аминогексил)-P²-(5'-аденозин) пирофосфат-сефарозы (II):



Оказалось, что алкогольдегидрогеназа и глицероккиназа связываются только сорбентом (I), миокиназа, 3-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа — только сорбентом (II), лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, пируваткиназа и 3-фосфоглицераткиназа — обоими сорбентами, а креатинкиназа и гексокиназа не связываются ни одним из них [Turkova, 1978]. Очевидно, что эта ситуация отражает различия в механизмах «узнавания» разными ферментами сходных по своей структуре субстратов: в одних случаях важна свобода концевой фосфата, в других — остатка аденина.

Выбор группы, по которой желательно осуществить посадку лиганда на матрицу, диктует и выбор способа активации матрицы или концевой группы спейсера для посадки с помощью конденсирующих агентов. Если лиганд имеет две (или более) одинаковые группы, а посадка желательна только по одной из них, то приходится либо примириться с тем, что половина связанных лигандов окажется неактивной, либо подыскать аналог лиганда, обладающий тем же

сродством к ферменту, но обеспечивающий нужный характер закрепления на матрице.

При использовании белков в качестве лигандов о выборе точки закрепления в большинстве случаев не может идти речи — таких точек, как правило, на поверхности белка много. К счастью, биологическая, и в частности ферментативная, активность белка нередко сохраняется при фиксации его в разных точках, если при этом активный центр белковой макромолекулы остается экспонированным. Разумеется, для некоторой доли молекул фермента точка связывания может оказаться в активном центре или вблизи него, что помешает взаимодействию с ним субстрата. Этим, в частности, обусловлено снижение суммарной активности при закреплении ферментов на матрицах.

Ситуация заметно ухудшается в том случае, когда связывание белкового лиганда с матрицей происходит не в одной, а в нескольких точках. Об этом уже упоминалось при анализе условий фиксации лигандов на BrCN-активированной сефарозе; довольно много было сказано и в предыдущей главе. Тем не менее имеет смысл остановиться на этом вопросе еще раз — в аспекте аффинной хроматографии. Многоточечное связывание белка с матрицей может приводить как к недоступности активного участка белковой молекулы, так и к ее денатурации за счет растяжения, т. е. к потере биологической активности.

В гл. 7 было подсчитано, что при концентрации активных центров связывания 1 мкмоль на 1 мл геля среднее расстояние между ними составляет примерно 80 Å; при этом уже возникает некоторая (еще небольшая) вероятность двухточечного связывания крупного белка (эквивалентный диаметр молекулы β-галактозидазы — примерно 140 Å). С этим полезно сопоставить приведенные выше данные о содержании активных групп в продажных активированных матрицах (15—20 мкмоль/мл для «Epoxy-activated Sepharose 6B», 50—80 — для «Act-Ultrogel AcA 22»). Очевидно, что средние расстояния между активными центрами уменьшаются здесь до 30 и даже 20 Å. Следовательно, с опасностью многоточечной сорбции белковых лигандов здесь приходится считаться. При необходимости следует уменьшать эффективную концентрацию активных центров путем преднамеренной частичной инактивации продажной матрицы перед посадкой на нее лиганда. Если же активирование матрицы идет в лабораторных условиях, то все это следует учесть при выборе исходной концентрации активирующего агента или продолжительности реакции активации.

Эти соображения в определенной степени сохраняют свою силу и при использовании низкомолекулярных лигандов, если в ходе аффинной хроматографии на них будут сорбироваться белки. Разумеется, ситуация здесь лучше, так как на поверхности белка может быть лишь небольшое число аффинных центров связывания, а действующие здесь силы уступают ковалентным связям, поэтому денатурации белка при посадке на аффинный сорбент опасаться не приходится (мы сейчас оставляем в стороне возможность связыва-

ния за счёт неспецифических взаимодействий — гидрофобных и ионных). Однако не исключена возможность столь прочной многоточечной посадки белка на аффинный сорбент, что его будет трудно снять.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КАЧЕСТВЕ ЛИГАНДОВ

Как уже упоминалось, НК в качестве лигандов могут обладать как групповой специфичностью (для белков хроматина, факторов управления трансляцией, нуклеаз и др.), так и индивидуальной (для индивидуальных мРНК, белков-регуляторов транскрипции и др.). Во втором случае на аффинном сорбенте должны быть закреплены вполне определенные участки генома. Это стало возможным после создания способов отбора и наработки в достаточных количествах строго идентичных фрагментов ДНК методами генной инженерии. В последнее время возникла еще одна область использования иммобилизованных НК — в качестве «праймеров» матричного синтеза. Эти приложения предъявляют разные требования к характеру фиксации НК на матрице. В первом случае расположение точек закрепления на молекуле НК может быть произвольным, во втором определенные и достаточно протяженные участки полинуклеотидной цепи должны быть свободны для комплементарного взаимодействия, а в третьем закрепление НК на матрице желательно осуществить лишь по одному определенному концу молекулы. Что же касается возможности реакций с активированными матрицами, то вдоль всей молекулы НК во множестве располагаются химически эквивалентные группы: аминокислоты нуклеиновых оснований, гидроксилы сахаров и др. В особом положении находится только концевой остаток фосфорной кислоты или сахара.

Для решения различных задач желательно иметь аффинные сорбенты как с денатурируемыми (однонитевыми) ДНК или РНК, так и с нативными двунитевыми молекулами. Условия их химического взаимодействия с матрицей различны — во втором случае часть аминокислот оснований участвует в образовании водородных связей между комплементарными нитями. Можно ожидать, что они труднее будут вступать в реакцию с активными группами матрицы, чем свободные аминокислоты однонитевых НК.

Все это обусловило сосуществование в настоящее время различных способов приготовления аффинных сорбентов с НК в качестве лигандов.

Ковалентное закрепление НК на матрицах

Сначала — о выборе самих матриц. Присоединять к матрице очень крупные молекулы НК неудобно, да и нет необходимости, так что их предварительно тем или иным способом дробят на фрагменты длиной 200—700 нуклеотидов или нуклеотидных пар (70—250 тыс.

Дальтон). Дробление осуществляют ультразвуком, срезанием в блендере или продавливанием раствора НК через иглу шприца. Для таких молекул в качестве матриц пригодны обычные крупнопористые материалы: агароза, целлюлоза и даже сефадекс G-200. Впрочем, иногда используют и сефадексы G-25 или даже G-10, рассчитывая, очевидно, на посадку нуклеиновой кислоты по поверхности гранул.

В качестве активированной матрицы для денатурированной ДНК и РНК часто используют BrCN-активированную сефарозу. По-видимому, посадка НК на такую матрицу происходит главным образом по аминок группам оснований, так как нативная ДНК садится плохо.

К влажной массе BrCN-активированной сефарозы, промытой, как описано выше, приливают равный объем раствора дробленной и денатурированной ДНК или РНК в фосфатном или ином буфере, не содержащем аминок групп, более или менее произвольного состава (от 0,01 М, рН 8, до 0,2 М, рН 6). Концентрацию НК берут в пределах 1—10 мг мл и ниже. Суспензию перемешивают в течение почти на холоду, затем хорошо промывают тем же буфером, иногда еще и соевым раствором или концентрированным буфером для снятия случайно сорбированной НК. Непрореагировавшие активные группы сефарозы блокируют, как обычно, например инкубацией с 2 М раствором глицина (рН 7,2). На 1 мл набухшей BrCN-активированной сефарозы удается посадить 1—3 мг ДНК [Ovchinnikov et al., 1978].

Концентрацию НК можно определить по количеству связанного фосфора (путем сжигания) [Arndt-Jovin et al., 1975] или по выходу УФ-поглощающего материала в супернатант после полного гидролиза НК соответствующей нуклеазой. Можно провести и химический гидролиз ДНК 5 М HClO_4 на кипящей бане в течение нескольких минут. Более грубую оценку, по-видимому, можно провести по УФ-поглощению суспензии сорбента в 50%-ном водном растворе полиэтиленгликоля ($M = 20\,000$), в котором суспензия сефарозы становится прозрачной. Калибровку следует вести растворами НК с известными концентрациями, в которых суспендировано такое же количество незамещенной сефарозы. Этот метод был предложен для определения количества связанного с сефарозой белка [Golovina et al., 1977], но не видно причин, по которым он был бы неприменим для НК с их заметно большей чем у белков, молярной экстинкцией. Правда, отдавая должное этому методу, Шурц и Рюдигер указывают на определенное неудобство манипулирования с очень вязкими суспензиями сефарозы в полиэтиленгликоле. Авторы предлагают метод спектрального определения количества белка (или НК), связанного с матрицей, посредством регистрации первой производной кривой поглощения света в диапазоне 250—350 нм [Schurz, Rüdiger, 1982].

Для предотвращения частичной ренатурации ДНК во время инкубации с сефарозой было предложено вести посадку в 90%-ном формамиде. 20 мл BrCN-активированной сефарозы суспендировали в 90%-ном водном растворе деионизованного формамида, содержащем

0,1 М MES-буфер, pH 6. В малом объеме такого же буфера растворяли ДНК аденовируса (0,25 мг/мл), денатурировали в течение 2 мин при 100°, быстро замораживали, а затем оттапывали, добавив предварительно 9 объемов формамида. В эту смесь вносили суспензию сефарозы и инкубировали при перемешивании в течение ночи при комнатной температуре. В этих условиях ДНК садилась количественно. Блокировку вели этаноламином. Готовый сорбент промывали сначала тем же буфером, затем 1 М NaCl, 0,1 М NaOH и водой [Van Eekelen et al., 1981]. Аналогичную методику ранее описал Сиддел для посадки ДНК на матрицу сефадекса G-10. Активацию сефадекса бромцианом проводили в лабораторных условиях, как описано выше [Siddell, 1978].

Посадку нативной двунитевой ДНК на неактивированные сефарозу или сефадекс можно осуществить с помощью водорастворимого карбодиимида [Alfrey, Inoue, 1978]. Для этого надежно депротеинизированную ДНК растворяли в 0,12 М Na-фосфатном буфере (pH 6,8) до концентрации 2 мг/мл и дробили ультразвуком при 0° до фрагментов размером 200—400 пар нуклеотидов; двунитевая структура сохранялась на 90% (однонитевые участки ДНК можно убрать обработкой нуклеазой S1). Около 4 мг ДНК растворяли в 3,6 мл 0,04 М MES-буфера (pH 6) и в раствор вносили 1,5 г набухшей и хорошо промытой матрицы. Избыток воды упаривали при температуре не выше 40°, перемешивая суспензию шпателем, добавляли 80 мг карбодиимида (СМС), растворенного в 1 мл воды, и выдерживали 8 ч при 45—50°. Еще дважды добавляли такое же количество СМС с промежуточным подсушиванием. Сорбент промывали 0,01 М Na-фосфатным буфером (pH 7), содержащим 0,1 М NaCl и 1 мМ ЭДТА, а затем суспендировали в 20 объемах 0,2 М NaHCO₃ (pH 10,2) и выдерживали 10 ч на холоду. Эта операция необходима для освобождения остатков СМС, свободно «висящих» на основаниях ДНК. Несвязанную ДНК удаляли 6-кратной промывкой в упомянутом нейтральном буфере.

Точно так же можно присоединять и денатурированную ДНК, однако в этом случае после каждого добавления СМС суспензию прогревали при 100° в течение 7 мин и быстро охлаждали. Здесь выдерживать смесь в течение 8 ч уже нет необходимости. На сефадексах G-25 и G-100 связывается до 64% внесенной в реакцию нативной ДНК, на сефарозе 4В — до 84%. Цифры, характеризующие связывание денатурированной ДНК, значительно ниже. Количественно на 1 мл влажного крупнопористого сефадекса G-100 удается посадить до 2 мг ДНК; емкость G-25, естественно, намного ниже [Weissbach, Poonian, 1974]. Полученный сорбент теряет не более 1% ДНК за полгода. Промывки 2 М NaCl, 6 М мочевиной и 0,4 М гуанидинхлоридом не снимают с него ДНК.

Ковалентную посадку денатурированной ДНК на целлюлозу недавно было предложено осуществлять с помощью эпокси-активации носителя 1,4-бутандиолдиглицидиловым эфиром. Активацию целлюлозы проводили по такой же схеме, как описано выше для сефарозы. 1 г целлюлозы («Cellex 410» фирмы «Bio-Rad») промывали

этанолом, водой и 0,6 н. NaOH, затем добавляли 2,5 мл оксирана и равный объем 0,6 н. NaOH, содержащего 4 мг/мл NaBH_4 . Суспензию инкубировали с перемешиванием в течение 18 ч при комнатной температуре. К 12-му часу добавляли еще 0,5 мл оксирана и 0,5 мл смеси NaOH и NaBH_4 . По окончании инкубации суспензию промывали водой, этанолом (от избытка оксирана), снова водой и 0,1 н. NaOH. К 50 мг активированной целлюлозы в объеме 220 мкл добавляли различные количества фрагментированной ультразвуком денатурированной (100°; 5 мин) тимусной ДНК, перемешивали и выливали

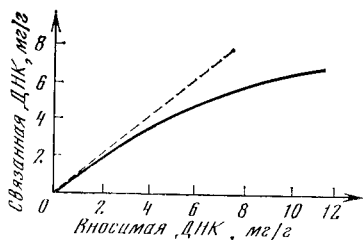


Рис. 133. Зависимость количества ДНК, связавшегося с целлюлозой, от исходного соотношения ДНК/целлюлоза [Moss et al., 1981]

на поверхность стекла, где выдерживали при 100 %-ной влажности 4—8 ч, а потом сушили на воздухе. Подсохшую пленку соскребали бритвой, энергично суспендировали в 1 мл воды (в смесителе «Vortex»), промывали водой (центрифугированием) от избытка ДНК, а непрореагировавшие оксираны блокировали 2 М раствором этаноламина в 50 mM Na-б-оратном буфере (рН 8,5).

Воспользовавшись меченой ДНК, авторы работы [Moss et al., 1981] выявили зависимость количества связанной ДНК и степени ее свя-

зывания от исходного соотношения ДНК/целлюлоза (в расчете на 1 г сухой целлюлозы). Из рис. 133 видно, что вплоть до соотношения 2 мг ДНК на 1 г целлюлозы ДНК связывается полностью, а при соотношении 12 мг/г связывается лишь половина внесенного количества ДНК. С учетом того, что 1 г «Cellex 410» при набухании занимает объем 3 мл, можно вычислить уровень максимального связывания ДНК — 2 мг на 1 мл упакованного аффинного сорбента, что соответствует приведенным выше данным.

Ранее было описано приготовление ДНК-целлюлозы путем ковалентного связывания лиганда с матрицей, активированной трихлортриазином [Biagioni et al., 1978]. Еще ранее Нойес и Старк предложили довольно громоздкий метод ковалентной посадки денатурированной ДНК на *m*-аминобензилоксиметилцеллюлозу фирмы «Miles», которую они предварительно диазотировали обработкой азотистой кислотой [Noyes, Stark, 1975]. В их методе интересно отметить, что для обеспечения полной денатурированности ДНК ее посадку на целлюлозу вели в 80 %-ном растворе диметилсульфоксида, подобно тому как в цитированной выше работе использовали 90 %-ный формамид. Аналогичная методика получения диазотированной бензилоксиметилцеллюлозы (DBM-целлюлозы) была описана Адамсом и др. [Adams et al., 1979]. Здесь денатурированную ДНК сажали на матрицу в 0,025 М К-фосфатном буфере в течение ночи при 4° с непрерывным перемешиванием, но затем тоже промывали 99 %-ным формамидом при 68°.

Бюнemann и соавторы сопоставили эффективность ковалентного

связывания и прочность связи денатурированной ДНК для трех вариантов крупнопористых матриц: BrCN-активированной сефарозы, диазобензилоксиметилсефакрила (по Нойес и Старк) и еще одного производного сефакрила в виде диазофенилтиоэфира с протяженным спейсером (диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола). Приготовление диазобумаги с модификатором последнего типа было описано Сидом [Seed, 1982], а Бюнеман и соавторы подробно описали модификацию этим же способом сефакрила S-500.

Авторов особенно интересовала устойчивость связи ДНК с сорбентом. Во всех случаях иммобилизованная ДНК снималась с матрицы довольно быстро (10—20 % в сутки) — при 45° в течение первых двух-трех дней. Это обстоятельство необходимо иметь в виду, так как снявшаяся с матрицы ДНК может весьма эффективно уводить из колонки очищаемую комплементарную ДНК или РНК, тем более что процесс связывания за счет гибридизации занимает иногда несколько дней. Из-за этого все аффинные сорбенты с ковалентно закрепленной ДНК необходимо длительно предынкубировать в условиях гибридизации (прединкубацию можно сократить до 3—5 ч, если вести ее при 70°). Существенные различия между тремя изучавшимися типами сорбентов имеются в их дальнейшем поведении. Сорбенты на основе BrCN-активированной сефарозы (или сефакрила) и диазобензилоксиметилсефакрила продолжали терять ДНК в течение многих дней после предынкубации, в то время как сорбент на основе диазофенилтиоэфира сефакрила, быстро утратив в ходе предынкубации до 50 % исходно фиксированной ДНК, далее оставался неизменным. По этой причине для ковалентного закрепления ДНК авторы выбрали последний из трех сорбентов. Можно добавить, что и гибридизация на сорбентах этого типа оказывается более совершенной, по-видимому, благодаря длинному спейсеру, обеспечивающему свободу ориентации закрепленной на сорбенте ДНК [Bünemann et al., 1982].

Нековалентное закрепление НК на матрицах

Как уже упоминалось, ковалентная посадка НК на матрицу может оказаться непригодной для создания аффинного сорбента с индивидуальной специфичностью, поскольку многие основания полинуклеотидной цепи будут заблокированы химической связью с носителем. По этой причине широкой популярностью пользуются различные методы нековалентной фиксации НК на матрицах. Исторически они были разработаны значительно раньше, но до сих пор не утратили своего значения. Простейший из этих методов использовал протяженность и гибкость нитей высокомолекулярных денатурированных ДНК, которые просто заглавливали в 4%-ный агар при температуре выше 90° [Bendich, Bolton, 1968]. Около половины внесенных в расплавленный агар молекул ДНК после его затвердевания оказываются столь надежно запутанными в сеть геля, что не выходят из него даже после длительной промывки. Агар затем нарезали ку-

сочками и продавливали через стальную сетку, формируя таким образом гранулы аффинного сорбента. На таких сорбентах в свое время было поставлено множество успешных опытов по гибридизации ДНК. Естественно, что аналогичную процедуру можно было использовать и для заплывания ДНК в агарозу [Schaller et al., 1972]. Приготовление этим способом ДНК-агарозы с использованием щелочной денатурации ДНК описано и сравнительно недавно [Lowe et al., 1979].

Фирма «PL-biochemicals» предлагает сорбент с заплыванной в 4%-ную агарозу денатурированной ДНК тимуса теленка, содержащий 1—3 мг ДНК в 1 мл геля (торговое название — «DNA-Agarose»). Такой аффинный сорбент с групповой специфичностью можно использовать, например, для очистки ДНК- и РНК-полимераз, Т4-полинуклеотидкиназы и других ферментов метаболизма ДНК.

Однако значительно больше возможности открывает нековалентное связывание НК с матрицей целлюлозы. Во-первых, его удастся осуществить и для относительно малых фрагментов НК, а во-вторых, с целлюлозой можно связать и нативную двунитевую ДНК. Способы такого связывания используют неспецифическую сорбцию, вернее, запутывание нитей НК в сетке целлюлозы. Здесь это происходит успешнее, чем в агарозе, у которой пустоты крупнее, а нити собраны в плотные жгуты. Во многих случаях связь оказывается достаточно прочной, чтобы обеспечить надежное задержание НК в колонке аффинного сорбента в условиях многократных промывок, связывания и элюции очищаемых макромолекул.

В случае более коротких нитей НК их после предварительной сорбции дополнительно фиксируют на матрице УФ-облучением. Такая фиксация фактически означает образование ковалентных химических связей в ситуации, когда активация близко расположенных, но химически инертных групп происходит за счет поглощения световой энергии. Существенное отличие от ранее рассмотренных вариантов посадки НК на химически активированные матрицы состоит в том, что НК облучается не в растворе, а после сорбции на целлюлозу. Это означает, что «пришивание» происходит в очень немногих точках, где соответствующие друг другу химические группы НК и матрицы во время сорбции случайно оказались достаточно сближены. Фиксированные таким образом молекулы НК значительно более эффективно могут обеспечить «узнавание» и комплементарное взаимодействие с другими молекулами НК или специфическими белками.

Олбертс и Херрик подробно описали методику сорбции на целлюлозе нативных или денатурированных молекул ДНК с массой порядка нескольких миллионов Дальтон. ДНК растворяли до концентрации 1—3 мг/мл в 0,01 М Трис-НСl (рН 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, и с перемешиванием вносили туда порошок тонковолокнистой целлюлозы (типа «Whatman CF-11») из расчета 1 г на 3 мл раствора ДНК. Суспензию перемешивали эпизодически до образования густой пасты, которую размазывали тонким слоем на поверхности стекла и сушили на воздухе при комнатной температуре в течение ночи [Alberts, Herrick, 1971]. Именно на этом этапе в процессе постепен-

ного высыхания происходит «запутывание» нитей ДНК в пространственной сетке целлюлозы. Затем слой сжидали, растирали в порошок и лиофилизировали (или досушивали в вакуум-эксикаторе). Сорбент замачивали в том же буфере, оставляли на сутки при 4°, а затем промывали буфером с добавлением NaCl до 0,15 М. До 50% внесенной ДНК связывалось с целлюлозой (0,5—1,5 мг/мл) столь прочно, что при выдерживании в буфере при 37° половина молекул ДНК снималась с целлюлозы лишь за 400 ч инкубации (дробление ДНК озвучиванием сорбента сильно облегчало этот процесс). Для денатурации раствор ДНК сначала прогревали при 100° в течение 15 мин и быстро охлаждали, а уже затем добавляли целлюлозу. Нативность или денатурированность ДНК не изменялись в процессе фиксации. Аффинные целлюлозные сорбенты с иммобилизованной тимусной ДНК выпускаются той же фирмой «PL-biochemicals» («DNA-cellulose»). Недавно была предложена некоторая модификация метода Олбертса и Херрика, которая, впрочем, свелась к замене Трис-буфера на 0,01 М К-фосфатный (рН 7) и увеличению концентрации ЭДТА до 5 мМ, а также к снижению расчетного соотношения ДНК и целлюлозы до 1 мг на 1 г сухой матрицы [Spillman et al., 1979].

«Пришивка» ДНК к целлюлозе с помощью УФ-облучения по методу Литмана [Litman, 1968] подробно описана в обзорной публикации [Weissbach, Poonian, 1974]. Она начинается с такого же высушивания пасты, содержащей смесь ДНК с набухшей целлюлозой, в тонком слое (на стенках стакана) на воздухе. На 1 г сухой целлюлозы берут 16 мг ДНК; вместо буфера используют 0,001 М или 0,01 М раствор NaCl. Снятую со стенок высохшую целлюлозу суспендируют в абсолютном этаноле. Ртутную лампу низкого давления помещают на расстоянии 10 см от поверхности суспензии (около 10^5 Эрг/мм²) и облучают в течение 15 мин с непрерывным медленным перемешиванием. Затем сорбент промывают 1 мМ NaCl на фильтре, расстилают тонким слоем на фильтровальной бумаге и снова сушат на воздухе. При указанном соотношении лиганда и матрицы без УФ-облучения прочно связывается лишь 10% ДНК, а с облучением — 90%. Сорбент хранят при комнатной температуре в течение нескольких лет.

В том же обзоре подробно описана методика пришивки под действием УФ-облучения РНК к целлюлозе, предложенная Смитом и соавторами. Единственное ее существенное отличие — в использовании метилцеллюлозы вместо обычной целлюлозы для снижения неспецифической сорбции по остаточным карбоксилам целлюлозы [Smith et al., 1972]. Впрочем, такую сорбцию нетрудно блокировать солью, и в недавней работе [Nygard et al., 1980] РНК УФ-облучением пришивали к обычной целлюлозе «Whatman CF-11». Ввиду заметно меньшей молекулярной массы РНК уровень связывания был ниже — около 30%.

Там же, наконец, можно найти и аналогичную методику пришивки полипиридиновой кислоты на стекловолоконистые фильтры типа GF/C, предложенную в работе [Scheldon et al., 1972]. Хими-

цёская фиксация поли(U) и других гомойолимеров на сефарозе была описана выше.

Недавно [Bearden, 1980] было отмечено, что описанные аффинные сорбенты с ДНК, пришитой к целлюлозе УФ-облучением в колонках, обладают неважными гидродинамическими качествами. Автор приводит методику пришивки ДНК УФ-облучением на сефадекс G-10. Сефадекс суспендировали в 0,02 М MOPS-буфере (рН 7,4), содержащем 10 мМ ЭДТА, из расчета 1 г на 5 мл буфера, вносили туда же ДНК (5—10 мг на 1 г сефадекса) и после набухания суспензии в течение нескольких часов на холоду сушили в вакууме (при комнатной температуре из-за последующей пришивки облучением высушивать на воздухе нет необходимости). Высушенную смесь ДНК с сефадексом суспендировали в 100%-ном этаноле (5 мл/г) и облучали коротковолновым УФ-светом (254 нм) в течение 30 мин (мощность облучения 300 мВт/см²). Этанол упаривали в высоком вакууме, и ДНК-сефадекс промывали дважды 2 М раствором гуанидинхлорида в том же буфере, но 0,1 мМ по ЭДТА, а затем — исходным буфером до прозрачности по A_{260} . По утверждению автора, связывалось до 90% ДНК, что с учетом степени набухания сефадекса G-10 дает аффинный сорбент с концентрацией ДНК 2—3 мг/мл. Ввиду использования мелкопористого сефадекса эта цифра кажется неожиданно высокой; впрочем, в работе не приводятся данных о молекулярных массах использованных ДНК. Отмечается значительное увеличение скорости течения жидкости через колонку ДНК-сефадекса по сравнению с ДНК-целлюлозой.

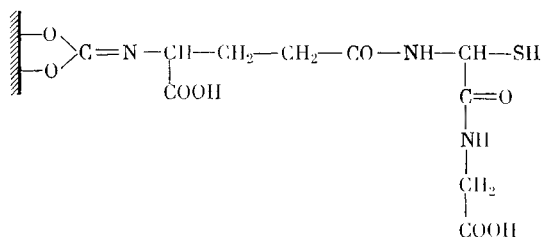
СОРБЕНТЫ ДЛЯ КОВАЛЕНТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

Ковалентная хроматография, как говорит само название, предполагает образование ковалентной химической связи между лигандом и веществом, подлежащим хроматографической очистке. Поэтому отнести этот метод к категории аффинной хроматографии можно лишь условно. Такое отнесение оправдывается двумя обстоятельствами. Во-первых, этот весьма общий (и потому не очень удачный, но уже укоренившийся) термин на самом деле подразумевает образование лишь двух типов ковалентной связи между лигандом и веществом: S—S и S—Hg, так что выделение ковалентной хроматографии в отдельную главу не оправдано. Во-вторых, необходимым условием для возникновения таких связей, очевидно, является наличие на лиганде и веществе свободных тиогрупп (—SH), способных образовать мостик S—S, или SH-группы и атома двухвалентной ртути, например в составе радикала —HgCl. В этом смысле можно говорить о необходимости определенного рода сродства между лигандом и веществом, которое, разумеется, не является строгим: один и тот же несущий SH-группу лиганд может связывать самые разнообразные белки, модифицированные нуклеиновые кислоты и низкомолекулярные соединения, если в них есть необходимый радикал. Так что речь мо-

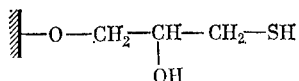
жет идти только об аффинных сорбентах с очень широкой групповой специфичностью.

Ковалентная хроматография ограничивается образованием двух видов связей с участием серы ввиду того, что эти связи лабильны — могут быть образованы, а затем разрушены в ходе окислительных и восстановительных реакций, идущих в мягких условиях, что позволяет сохранять нативность сорбируемых веществ. Лабильность связей, очевидно, является необходимым условием любого хроматографического процесса.

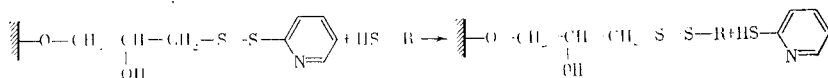
Наибольшим распространением пользуются в настоящее время два типа лигандов, несущих SH-группы. В первом из них глутатион своей концевой аминогруппой присоединен к BrCN-активированной сефарозе:



Молекула глутатиона выступает здесь в качестве гидрофильного спейсера. Во втором лигандом служит 1-тио-2-оксипропил, присоединенный к матрице агарозы прочной эфирной связью:



Тиогруппы этих двух лигандов не активированы. Вещества, имеющие свободные, но тоже не активированные SH-группы, могут связаться с такими лигандами, образуя связи S—S в ходе постепенного окисления тиогрупп. Процесс происходит намного быстрее, когда один из партнеров (удобнее, если лиганд) активирован остатком тиопиридина. Реакция присоединения вещества (HS—R) идет путем замещения этого остатка. Для второго лиганда, например, схема реакции такова:



Активированные таким образом сорбенты для ковалентной хроматографии выпускаются в готовом виде фирмой «Pharmacia» под торговыми названиями «Activated Thiol-Sepharose 4B» и «Thiopropyl-Sepharose 6B» (фирмы «Sigma» и «PL-biochemicals» — только первый из них). Они отличаются друг от друга в первую очередь концентрацией лигандов: 1 ммоль на 1 мл сорбента в первом случае и 20 — во втором. Это различие может быть выгодно использовано

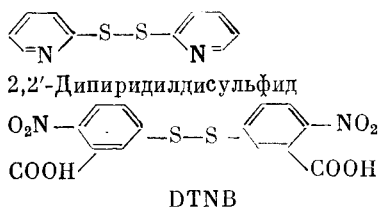
для связывания различных веществ. Оба сорбента поставляются в виде лиофилизированных препаратов (с консервирующими добавками), которые выдерживают длительное хранение на холоду. Их водные суспензии следует хранить также на холоду при pH 4—6 и не слишком долго (недели), так как тиоловые группы постепенно окисляются кислородом воздуха (лучше хранить под азотом). Окисление очень ускоряется при нейтральных и щелочных значениях pH. Впрочем, восстановить концентрацию тиоловых групп можно промывкой сорбента восстанавливающим агентом, например 1%-ным раствором дитиотреитола (ДДТ) или 0,5 М раствором β-меркаптоэтанола в слегка щелочной среде, например в 0,3 М Na-бикарбонатном буфере (pH 8,4), содержащем 1 мМ ЭДТА. Для завершения реакции восстановления сорбент выдерживают с эпизодическим перемешиванием в этом растворе 40 мин, а затем обильно промывают 0,1 М раствором CH₃COOH, содержащим 0,5 М NaCl и 1 мМ ЭДТА.

Кстати, таким же образом продажные активированные сорбенты можно нацело перевести в восстановленную SH-форму, что может быть необходимо, например, для связывания вещества по атому ртути.

Элюцию вещества с лиганда осуществляют также путем восстановления S—S-связи, пропуская в качестве элюента через колонку раствор цистеина (5—20 мМ в буфере с pH 8), меркаптоэтанола или ДТТ. Примеры режимов элюции приведены ниже; отметим только, что при очистке белка концентрация восстанавливающего агента в элюенте должна быть минимально необходимой, чтобы избежать восстановления и разрыва внутримолекулярных S—S-связей белка.

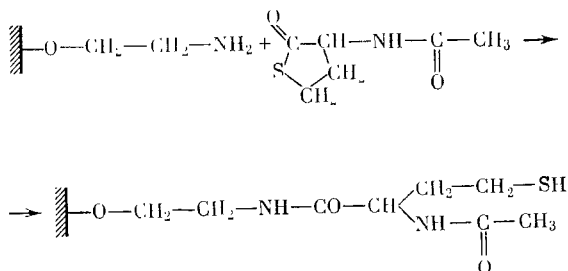
После снятия вещества сорбент оказывается в восстановленной, но неактивированной форме. Для повторного использования его следует активировать промывкой 1,5 мМ раствором 2,2'-дипиридилдисульфида (фирма «Sigma») при pH 8. При этом S—S-связь разрывается, а остатки тиопиридина снова блокируют свободные SH-группы сорбента и одновременно активируют их для повторного использования. Подробное описание такой активации и посадки глютамина на сефарозу можно найти в работе [Brocklehurst et al., 1974].

Иногда для активации тиоловых сорбентов используют 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойную кислоту) (DTNB). Механизм активации аналогичен описанному выше [Lin, Foster, 1975; Laurell et al., 1977].



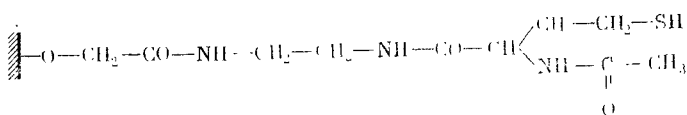
Недавно Фейст и Данна описали приготовление тиолового сорбента на основе целлюлозы. Концентрация лиганда в этом сорбенте значительно выше, чем в агарозном — 90 мкмоль на 1 мл, а стои-

мость — в 50 раз меньше. Синтез его прост и занимает 4 ч. Исходной матрицей служит аминоэтилцеллюлоза фирмы «Sigma». В 8%-ную суспензию такой целлюлозы в 0,5 М NaHCO₃ (pH 9,7) добавляли тиолактон N-ацетилгомоцистеина (фирма «Sigma») из расчета 1,2 г на 1 г сухой целлюлозы и перемешивали при комнатной температуре 3 ч. Реакция присоединения лиганда к матрице идет по следующей схеме:



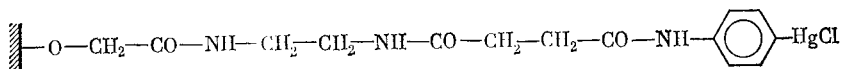
Очевидно, что такой сорбент частично сохраняет анионные свойства за счет остаточных свободных аминогрупп АЕ-целлюлозы, поэтому аффинную хроматографию следует вести в присутствии достаточной концентрации соли, блокирующей неспецифическую ионную сорбцию по этим группам [Feist, Danna, 1981]. Использование этого сорбента для разделения меркурированной и немеркурированной РНК рассмотрено ниже как пример применения аффинной хроматографии.

Очень сходный по структуре лиганда (отличие — только в длине спейсера) тиоловый сорбент на основе агарозы выпускает фирма «Bio-Rad» под торговым названием «Affi-Gel 401»:



Оба рассмотренных сорбента находятся в неактивной форме и могут быть активированы, как описано выше.

В числе аффинных сорбентов, выпускаемых той же фирмой, есть еще один, предназначенный также для ковалентной хроматографии. В отличие от всех предыдущих он на конце довольно длинного спейсера несет атом ртути, охотно связывающий меркаптосоединения. Такой сорбент можно использовать, например, для выделения из смеси пептидов, содержащих цистеин:



Его торговое название «Affi-Gel 501».

ФИРМЕННЫЕ АФФИННЫЕ СОРБЕНТЫ

Разнообразие готовых аффинных сорбентов (главным образом на основе агарозы), которые выпускают фирмы «PL-biochemicals», «Sigma» и «Pierce», настолько велико, что вряд ли имеет смысл воспроизводить список из более чем 80 наименований, предлагаемый в каталоге первой из них, или еще более внушительный список из каталога фирмы «Sigma».

Подавляющее большинство этих сорбентов было неявным образом упомянуто в предыдущем изложении. Торговые наименования, принятые фирмами, указывают используемый лиганд, что позволяет легко ориентироваться при разборе экспериментальных данных, публикуемых в периодической литературе. Своеобразные аффинные сорбенты на основе смешанных агарозно-полиакриламидных гелей фирм «ЛКВ» и «IBF» были довольно подробно охарактеризованы; их наименования также легко расшифровываются.

Менее удобна система обозначений, принятая фирмой «Bio-Rad». Все ее аффинные сорбенты носят наименование «Affi-Gel», а лиганд защифрован в большинстве случаев цифрой. Для удобства читателей, не имеющих под рукой каталога фирмы «Bio-Rad», расшифруем здесь эти цифры, тем более что число сорбентов, выпускаемых фирмой, невелико, а по структуре они в большинстве случаев отличаются от сорбентов, поставляемых другими фирмами.

В конце предыдущего раздела были рассмотрены сорбенты для ковалентной хроматографии типов «Affi-Gel 401» и «Affi-Gel 501». Выше в данной главе при рассмотрении структуры спейсеров были приведены структуры агарозных матриц «Affi-Gel 102» и «Affi-Gel 202», несущих на концах соответственно аминокгруппу и карбоксил, а также матрицы на основе полиакриламидного геля «Aminoethyl Bio-Gel P2» и «...P 150».

Под названием «Affi-Gel 601» выпускается упомянутый выше фенолборный сорбент на основе относительно мелкопористой полиакриламидной матрицы P-6 той же фирмы. Наименования «Affi-Gel 10» и «Affi-Gel 15» обозначают соответственно активированные присоединением N-оксисукцинимидов 10- и 15-членные гидрофильные спейсеры. При посадке лигандов в водных буферах первый из них несет небольшой отрицательный заряд, а второй — положительный. Это значительно улучшает условия присоединения к ним щелочных и кислых белков.

Помимо аффинного сорбента на основе агарозы, несущего краситель «Cibacron Blue F3GA» («Affi-Gel Blue»), фирма выпускает еще два сорбента, несущие, помимо этого красителя, также анионообменные (диэтиламиноэтил) или катионообменные (карбоксиметил) группы: «DEAE Affi-Gel Blue» и «CM Affi-Gel Blue». Первый из них предназначен для высокоэффективной очистки IgG, который обычно сорбентом не задерживается, в то время как почти все остальные белки сыворотки (кроме трансферрина) остаются на колонке. Особенно существенно то обстоятельство, что в отличие от обычной

очистки на DEAE-целлюлозе IgG выходит из колонки свободным от примесей протеаз. Второй из двух бифункциональных сорбентов предназначен для очистки сывороточных альбуминов.

Ввиду особой популярности аффинных сорбентов фирмы «Pharmacia Fine Chemicals» приведем здесь их полный список (по каталогу 1983 г.) в том порядке, как они встречались в данной главе, без комментариев, поскольку названия говорят сами за себя:

«CNBr-activated Sepharose 4B»	«2', 5' ADP-Sepharose 4B»
«CN-Sepharose 4B»	«Blue Sepharose CL-6B»
«AN-Sepharose 4B»	«Red Sepharose CL-6B»
«Activated CN-Sepharose 4B»	«Lysine-Sepharose 4B»
«Epoxy-activated Sepharose 6B»	«Arginine-Sepharose 4B»
«Con A-Sepharose»	«Heparin-Sepharose CL-6B»
«Lentil Lectin-Sepharose 4B»	«Poly (U)-Sepharose 4B»
«Wheat germ Lectin-Sepharose 6MB»	«Poly (A)-Sepharose 4B»
«Helix pomatia Lectin-Sepharose 6MB»	«Activated Thiol-Sepharose 4B»
«Gelatin-Sepharose 4B»	«Thiopropyl-Sepharose 6B»
«5' AMP-Sepharose 4B»	«Chelating Sepharose 6B»
	«Protein A-Sepharose CL-4B»

В 1984 г. фирмы «Pharmacia» и «PL-Biochemicals» объединились. Все упоминавшиеся аффинные сорбенты обеих фирм теперь можно найти в каталоге, именуемом «Pharmacia — PL-Biochemicals».

ПОДГОТОВКА И ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

ВЫБОР СОРБЕНТА И ХАРАКТЕРА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Выбор сорбента диктуется, очевидно, биологической специфичностью интересующего исследователя вещества или веществ. Необходимо сразу же уяснить себе вопрос о наличии в исходном препарате других компонентов со сходной биологической активностью. В любом случае удобно воспользоваться готовым продажным сорбентом с групповой специфичностью. При наличии в препарате сходных и ненужных компонентов задачу очистки следует попытаться решить путем динамического фракционирования, опираясь на различия силы родства сходных компонентов к лиганду или на аффинную избирательную элюцию. Если сходные по своей биологической специфичности компоненты тоже представляют интерес, то динамический вариант является единственно приемлемым. Как обычно, в этом случае надо воспользоваться достаточно длинной колонкой. Если же сходных компонентов нет, а готовый сорбент с подходящей групповой специфичностью имеется, очистку можно вести

в статическом варпанте хроматографии — путем сорбции, промывки и десорбции вещества с широкой и короткой колонки. Наконец, если такого сорбента нет, то приходится решать проблему создания аффинного сорбента с индивидуальной специфичностью: выбирать лиганд, матрицу, способ иммобилизации лиганда на матрице и способ элюции. Обоснования общего характера для такого выбора были подробно рассмотрены выше, но, конечно, в каждом частном случае могут возникнуть свои специфические проблемы. Хроматографическую очистку на аффинном сорбенте с индивидуальной специфичностью, как правило, удается вести в статическом варпанте хроматографии.

ВЫБОР КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИГАНДА

При синтезе аффинного сорбента (если считать, что все его компоненты выбраны обоснованно) перед экспериментатором встают практические вопросы количественных соотношений, и в первую очередь задача выбора оптимальной концентрации (плотности пространственного расположения) лиганда на матрице. Для этого в описанных выше процедурах посадки лиганда он может варьировать соотношения количеств лиганда и матрицы, а также условия реакции, в частности ее продолжительность. Хотя подбор оптимальной концентрации лиганда в конце концов ведется эмпирически, имеет смысл провести некоторое общее рассмотрение этого вопроса, с тем чтобы прояснить хотя бы порядки величин, с которых следует начинать такой подбор в каждом конкретном случае.

Равно весие обратимой реакции связывания очищаемого вещества (E) со специфическим лигандом (L) в первом приближении определяется соотношением их концентраций (при условии равномерного распределения вещества по объему сорбента) и константой диссоциации (K_L) комплекса вещество—лиганд (EL): $[E][L] = K_L[EL]$. Можно показать [Turkova, 1978], что если суммарная (исходная), молярная концентрация вещества в объеме геля (E_0) заведомо меньше, чем концентрация лиганда, т. е. $[E_0] \ll [L]$, то равновесная доля связанного с лигандом вещества (EL) с хорошей степенью приближения оценивается соотношением $[EL]/[E_0] = [L]/(K_L + [L])$.

Отсюда следует важный практический вывод: для полноты связывания необходимо выполнение условия $[L] \gg K_L$. При выборе концентрации лиганда в сорбенте надо опираться на значение константы диссоциации аффинного комплекса. Здесь следует проявлять осторожность в отношении использования значений K_L , известных из взаимодействия аффинных пар в растворе; их сродство на сорбенте, как уже упоминалось, может быть слабее, а значение K_L — соответственно больше. Тем не менее для оценки порядка величины эти цифры использовать можно.

То, что речь может идти именно о порядках величин, видно из следующего сопоставления [Turkova, 1978]. Для взаимодействия фермента с субстратом в большинстве случаев $K_L \approx 10^{-5}$ М. Для пары антиген—антитело на иммунсорбенте вариации могут быть.

довольно широкими (10^{-5} — 10^{-8} М). Связь гормонов с рецепторами заметно прочнее (10^{-9} — 10^{-10} М). Наконец, для белков, ведущих в крови и через мембраны перенос витаминов, гормонов и других низкомолекулярных соединений (транспортных белков), сродство может быть очень сильным и K_L снижается иной раз до 10^{-13} — 10^{-16} М.

Из приведенных цифр следует, что для очистки ферментов следует использовать сорбенты с концентрацией лигандов 10^{-3} М и выше, т. е. начиная с содержания 1 мкмоль лиганда на 1 мл сорбента. Для иммуносорбентов, сорбентов с участием белковых рецепторов или тем более транспортных белков концентрацию лигандов без ущерба для полноты аффинного связывания можно снижать еще на несколько порядков. Это обстоятельство может иметь важное значение в свете не раз подчеркивавшейся опасности многоточечной фиксации белковых лигандов на матрице или же взаимных помех и затрудненной элюции в случае сорбции крупных белков на тесно расположенных низкомолекулярных лигандах. Кроме того, избыток неиспользуемых лигандов может явиться причиной повышенной неспецифической сорбции.

Если названные обстоятельства не лимитируют концентрацию лигандов в сорбенте, то естественно, что с позиций полноты использования матрицы следует увеличивать эту концентрацию вплоть до максимума, обусловленного плотностью расположения активированных групп на матрице (для 4%-ной агарозы и целлюлозы — до 0,1 М).

Как указывалось, большинство продажных сорбентов содержит лиганды в концентрации 10^{-3} — $2 \cdot 10^{-2}$ М (1—20 мкмоль/мл), а сорбенты на базе ультрагелей — до $8 \cdot 10^{-2}$ М.

ЗАГРУЗКА СОРБЕНТА

В статическом варианте аффинной хроматографии препарат на сорбент часто вносят в объеме, перемешивая его раствор с суспензией сорбента, а затем уже переносят в колонку (или отмывают и элюируют на фильтре). Можно вносить раствор препарата и на колонку. Количество белка в исходном препарате (или объем колонки при заданном количестве белка) следует выбирать, стремясь, с одной стороны, к максимальной загрузке сорбента, но при условии сохранения соотношения $[E_0] \ll [L]$. С другой стороны, увеличение загрузки требует и заметно большей длительности операции посадки белка (или НК) на сорбент. Дело в том, что закрепление крупных молекул белков на лигандах загромождает поры и каналы внутри гранул, замедляя тем самым диффузию в них следующих молекул белка и достижение истинного равновесия связывания. Из этого следует важная практическая рекомендация. При использовании высоких концентраций белка в исходном препарате надо выдерживать суспензию сорбента в контакте с препаратом (при перемешивании) в течение 0,5—1 ч и лишь после этого начинать промывку.

Порядок максимальной загрузки колонки белком можно оценить из сопоставления его концентрации в объеме сорбента с concentra-

цией лиганда. Например, для сорбента с $[L] = 2 \cdot 10^{-3}$ М (2 мкмоль лиганда в 1 мл сорбента), приняв $[E_0] = 0,02 \cdot [L] = 4 \cdot 10^{-5}$ М, и белка с молекулярной массой 100 000 Дальтон найдем, что допустимая концентрация белка в сорбенте — примерно 4 мг/мл. Отсюда легко рассчитать объем колонки для заданного количества белка или объем препарата по известной исходной концентрации белка в растворе и объему колонки. При использовании аффинной хроматографии на ранних стадиях очистки эта цифра, подсчитанная для очищаемого компонента, может дать очень высокое значение суммарной

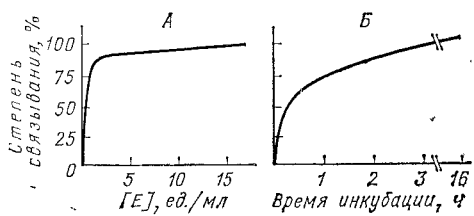


Рис. 134. Кинетика аффинного связывания лактатдегидрогеназы на 5'-АМР-сефарозе [Turkova, 1978]

А — степень связывания за 30 мин в зависимости от концентрации фермента;

Б — кинетика связывания для фиксированной концентрации фермента (0,1 ед./мл)

концентрации белков в исходном препарате. Процесс установления аффинного равновесия в этом случае будет лимитироваться вязкостью раствора препарата. Исходная суммарная концентрация белка в препарате не должна превышать 50 мг/мл, независимо от содержания в нем нужного белка. С другой стороны, чрезмерное снижение исходной концентрации также оказывается невыгодным и приводит к значительному замедлению процесса связывания белка.

Из рис. 134, А видно, что за 30 мин высокая степень связывания лактатдегидрогеназы на 5'-АМР-сефарозе достигается лишь начиная с исходной концентрации фермента 1 ед./мл (2 мкг/мл, если считать, что активность фермента составляет ориентировочно 500 ед./мг). Дальнейший ход зависимости полноты связывания от концентрации фермента имеет пологий характер. Процесс связывания фермента при малой его концентрации сильно растягивается во времени (рис. 134, Б). Даже при исходной концентрации 0,1 ед./мл связать фермент полностью удастся лишь за 16 ч. Очевидно, что такое замедление нельзя объяснить с чисто кинетических позиций соотношения концентрации реагентов (в растворе). Возможно, что имеет место временное задерживание диффундирующих молекул на местах неспецифической сорбции. Свой вклад дает и замедление диффузии белков внутри гранул за счет столкновений с сеткой матрицы.

Даже при статическом варианте аффинной хроматографии не рекомендуется использовать более 15—25% эффективной емкости колонки для данного вещества. Под эффективной удельной емкостью сорбента условимся понимать максимальное количество вещества, например белка, которое может связаться с ним (в расчете на 1 мл) при перемешивании в свободном объеме за достаточное для установления равновесия время, так что в жидкой фазе концентрация этого вещества будет оставаться практически нулевой. Эффективную удельную емкость сорбента для чистого сорбируемого вещества (аф-

финанта) можно определить в предварительных опытах, постепенно увеличивая количество вещества, вносимого в суспензию сорбента, и контролируя полноту его удаления из жидкой фазы. Эффективная емкость колонки равна произведению эффективной удельной емкости сорбента на объем геля в колонке. При наличии уже готовой колонки ее эффективную емкость можно определить методом фронтального анализа. На колонку медленно подают раствор вещества известной концентрации и с самого начала измеряют объем вытекающей из нее жидкости. Регистрируют его в момент скачкообразного появления вещества в исходной концентрации на выходе из колонки. Вычитая из этого объема известный свободный объем колонки, можно подсчитать объем исходного препарата, израсходованный на насыщение емкости колонки. По этому объему и исходной концентрации вещества в препарате легко подсчитать количество вещества, сорбированного на колонке, т. е. ее эффективную емкость [Lowe, 1979].

Умеренное использование эффективной емкости колонки позволяет разумно ограничить время посадки препарата без его потерь. Кроме того, элюировать вещество с сорбента удастся в малом объеме. Это обусловлено тем, что оно сорбируется в сравнительно легко доступном наружном слое гранул. При полном использовании эффективной емкости колонки трудно избежать значительного разбавления вещества в ходе его элюции.

Впрочем, иногда в препаративных опытах имеет смысл примириться с некоторыми потерями вещества в интересах более полного использования аффинного сорбента, а также с заметным разбавлением вещества, если имеется возможность последующего его концентрирования.

Совокупность изложенных соображений ложится в основу выбора объема колонки для очистки определенного количества препарата или, наоборот, рациональной загрузки колонки известного объема. О геометрии колонки было сказано выше. В статическом варианте аффинной хроматографии отношение высоты колонки к ее диаметру можно брать в пределах от 5 : 1 до 1 : 1.

На практике нередко возникает такая ситуация, когда уже готовая колонка с аффинным сорбентом оказывается загруженной лишь на малую долю своей эффективной емкости. Весь препарат в этом случае сорбируется в верхнем тонком слое сорбента. Для динамического хроматографического фракционирования это хорошо, но в обычном варианте статической аффинной хроматографии такая ситуация невыгодна уже тем, что в процессе элюции, продвигаясь по всей длине колонки, полоса очищенного вещества будет расширяться хотя бы за счет продольной диффузии в элюенте. Проблема легко разрешается — перед началом элюции снабженную адаптором колонку следует перевернуть и элюировать обратным током жидкости.

Имеет смысл сделать дополнительные замечания, относящиеся к выбору объема препарата. Вопросов чрезмерной вязкости или слишком малой концентрации мы уже касались. Но и оставаясь в пределах

приемлемых концентраций вещества, объем препарата можно еще варьировать достаточно широко. Практика посадки препарата на сорбент в свободном объеме рекомендует отношение объема раствора препарата к объему влажного сорбента, равное 2 : 1. Это обеспечивает удобное перемешивание без ненужного разбавления раствора вещества, ведущего к замедлению посадки. Если же имеющийся объем препарата уже превосходит во много раз расчетный объем сорбента, то имеет смысл сажать вещество на аффинный сорбент прямо в колонке. Скорость подачи раствора препарата на колонку должна быть умеренной, в пределах 1—20 мл/см²·ч, в зависимости от степени сродства вещества к лиганду, размера молекул вещества и вязкости исходного раствора. Если сродство вещества к лиганду выражено слабо, то во избежание потерь вещества и необходимости снижать скорость посадки до неприемлемо малых значений раствор препарата следует вносить на колонку в объеме заведомо меньшем, чем ее свободный объем, и до начала промывки выждать достаточное время (0,5—1 ч) для осуществления полной посадки. Именно такая ситуация нередко возникает при очистке ферментов на сорбентах, содержащих в качестве лигандов аналоги их субстратов или ингибиторов.

ВЫБОР БУФЕРА ДЛЯ ПОСАДКИ ВЕЩЕСТВА

Этот выбор диктуется в основном стремлением сохранить нативность очищаемого белка и максимально уменьшить неспецифическую сорбцию других компонентов исходной смеси. Само аффинное связывание вещества с лигандом, как правило, от состава буфера жидкой фазы зависит мало. Интересами сохранения нативности и растворимости белка диктуются выбор pH, наличие соли, а иногда (например, для белков мембран) введение в буфер добавок органических растворителей или детергентов. Все это определяется известными свойствами данного белка. Неспецифическая сорбция примесей, в частности балластных белков, на матрице и спейсерах происходит за счет тех же самых сил (притяжения разноименно заряженных групп, водородных связей и гидрофобных взаимодействий), которые обуславливают и биоспецифическое связывание вещества с лигандом. Избирательность и прочность аффинной связи обусловлены кооперативным действием различных сил в области связывания, где они дополняют друг друга. Благодаря такой кооперации имеется возможность ввести в буфер факторы, ослабляющие действие сил какого-либо типа или даже всех их одновременно, но в такой степени, что биоспецифическое аффинное взаимодействие будет ослаблено лишь частично, в то время как неспецифическую сорбцию удастся подавить практически полностью.

Этими факторами служат, как обычно, повышенная концентрация соли, наличие гуанидинхлорида и мочевины, органических растворителей и детергентов. В зависимости от доминирующего характера неспецифической сорбции можно отдать предпочтение какому-нибудь одному из них или их комбинации. Разумеется, возможны слу-

чаи, когда определенные силы взаимодействия доминируют и в аффинном связывании. Это следует учитывать. Например, если биоспецифичность обеспечивается главным образом за счет электростатического взаимодействия с заряженными группами лиганда, то введение концентрированной соли в буфер может оказаться неприемлемым ввиду ослабления аффинного средства. В этом случае подавления неспецифической сорбции следует добиваться иными способами, например за счет изменения рН. Число вариантов здесь велико, и выбор их производится эмпирически. Общее правило таково: в интересах полноты очистки вещества буфер для его посадки на аффинный сорбент должен содержать максимальные концентрации нужных для подавления неспецифической сорбции агентов, которые еще не сказываются ослаблением самого аффинного взаимодействия. Эти концентрации легко установить в модельных опытах, отмечая момент начала освобождения сорбированного вещества в ходе постепенного увеличения содержания в буфере используемых агентов. Поскольку процессы образования и нарушения аффинной связи не вполне эквивалентны, найденные концентрации следует проверить в опыте по посадке вещества на аффинный сорбент.

Какие из препятствующих молекулярному взаимодействию агентов действительно нужны для подавления неспецифической сорбции — в каждом конкретном случае решает эксперимент. Использование «для страховки» всех возможных средств подавления сорбции неразумно. Дело в том, что неспецифическая сорбция может и помогать аффинному взаимодействию. Так, можно себе представить механизм, по которому и само нужное вещество сначала лабильно связывается с лигандом или его спейсером за счет неспецифического гидрофобного взаимодействия, а потом, изменив свою ориентацию в пространстве, «нащупывает» и биоспецифическое взаимодействие, возникающее при сближении участков «взаимного узнавания» на поверхностях вещества и лиганда. Механизм удерживания вещества в комплексе с лигандом может реализоваться и за счет кооперативного действия биоспецифических сил и гидрофобного взаимодействия; такой механизм иногда называют «сложным аффинным средством» (*compound affinity*) [O'Carra et al., 1974].

В большом числе случаев борьбу с неспецифической сорбцией ограничивают введением в посадочный буфер 0,5 M NaCl и выбором оптимального значения рН. Кстати, следует отметить, что оптимальное с точки зрения посадки на аффинный сорбент значение рН буфера вовсе не обязательно должно совпадать с $pH_{\text{опт}}$ для самой реакции ферментативного катализа.

Иногда на свежеприготовленном сорбенте теряется заметная часть выделяемого вещества из-за необратимой сорбции, которая при повторном использовании сорбента уже не проявляется. Места такой сорбции следует насытить, пропуская через сорбент 10-кратное против расчетного количество неочищенного вещества и элюируя выбранным для работы способом все, что удастся элюировать. Этот эффект может быть высокоспецифичным для данного белка, так что подавить его насыщением сорбента другим белком, например БСА,

оказывается невозможным. Трудно сказать, лежит ли в основе этого явления многоточечное связывание белка со случайными, особо расположенными комбинациями лигандов или какой-либо другой механизм. Наблюдалось, что некоторые сорбенты утрачивали описываемую способность к необратимой сорбции после хранения при 4° [Turkova, 1978].

Выбрав таким образом буфер, в него переводят как аффинный сорбент, так и вносимый на него препарат. Последнюю операцию легко осуществить диализом или гель-фильтрацией, а иногда и просто разбавлением.

ВЫБОР ЭЛЮЕНТА И МЕТОДА ЭЛЮЦИИ

За посадкой препарата на сорбент следует этап собственно очистки — вымывания из геля прочих компонентов исходной смеси. Промывку сорбента ведут на фильтре или в колонке, в зависимости от выбора метода элюции. В качестве раствора для промывки обычно используют тот же буфер, что и при посадке препарата на сорбент. Иногда несколько увеличивают содержание в нем агентов, способствующих снятию с сорбента неспецифически сорбировавшихся примесей, имея в виду, что уже образовавшийся комплекс вещества с лигандом устойчивее к их воздействию, чем процесс образования этого комплекса.

За промывкой следует элюция очищенного вещества с сорбента. Как уже упоминалось, здесь можно использовать два подхода: специфическую (конкурентную) элюцию и неспецифическую. Первый подход базируется на конкурентном освобождении вещества из комплекса с лигандом сорбента либо за счет элюции раствором свободного лиганда (лучше иного, чем на сорбенте), который связывает вещество в виде растворимого комплекса, удаляемого с элюентом, либо за счет внесения в элюент аналога вещества, способного образовывать биоспецифический комплекс с лигандом сорбента, вытесняя очищаемое вещество.

Описаны случаи, когда осуществление конкурентной элюции требует внесения в элюент не одного, а двух реагентов. Очевидно, что в этих случаях вещество снимается с сорбента только в виде тройного комплекса. Так, при очистке малатдегидрогеназы из *Vac. subtilis* или *E. coli* на колонке сорбента, несущего триазиновый краситель «Matrex Gel Red», элюцию вели фосфатным буфером, содержащим 0,15 мМ НАД⁺ и 10 мМ яблочной кислоты. Ни один из этих двух реагентов порознь не снимал фермент с колонки — ее промывали последовательно растворами каждого из них в тех же концентрациях, что указаны выше [Smith et al., 1982].

Конкурентная элюция вносит дополнительный этап селективного отбора искомого вещества, что может существенно повысить степень его очистки, особенно в том случае, когда оно было фиксировано на сорбенте, обладающем групповой специфичностью. Однако этот метод имеет и свои недостатки. Для успешного освобождения вещества из связи с сорбентом конкурирующий лиганд или

аналог должны обладать достаточно высокой степенью сродства соответственно к веществу или лиганду сорбента и находиться в растворе в достаточном избытке. Элюция раствором свободного лиганда с такой же степенью сродства к веществу, как у лиганда на сорбенте, может быть успешно осуществлена за счет многократного превышения концентрации свободного лиганда по сравнению с иммобилизованным. При любом способе с сорбента, как уже упоминалось, будет элюироваться смесь искомого вещества с конкурентом, которую надлежит еще разделить с помощью дополнительной операции фракционирования, причем в первом из двух вариантов конкурентной элюции это будет не просто смесь, а прочный биоспецифический комплекс. Во втором варианте такой комплекс останется на сорбенте, что потребует специальных усилий по его регенерации. Кроме того, метод конкурентной элюции дорог, поскольку он связан со значительным расходом очищенного биологического препарата. Тем не менее высокая эффективность очистки и мягкость условий элюции заставляют иногда примириться с указанными трудностями и отдать предпочтение конкурентному методу элюции. Задача экспериментатора в этом случае состоит в том, чтобы, исходя из известных ему строения и свойств как очищаемого вещества, так и сорбента, подобрать и испытать серию конкурентов первого или второго рода, оценить их эффективность и минимально необходимую концентрацию в элюенте.

Подбор можно вести в пробирках, тем или иным способом оценивая эффект освобождения вещества из комплекса с сорбентом. Для статической хроматографии такое освобождение должно быть полным уже при одном суспендировании сорбента с веществом в растворе конкурентного элюента. Для осуществления динамической хроматографии на колонке достаточно, чтобы равновесие сорбции искомого вещества заметно сдвинулось в пользу жидкой фазы. Этого обычно удается добиться, используя относительно небольшую концентрацию конкурирующего агента — того же порядка, что и концентрация лиганда на сорбенте, т. е. нередко менее 10 мМ.

Следует заметить, что при необходимости использовать для окончательной очистки вещества в препаративном опыте особо дорогостоящий конкурирующий агент имеет смысл провести предварительную очистку (нередко на том же самом аффинном сорбенте) с использованием менее специфического, но зато дешевого элюента. Такой подход был использован недавно для препаративного получения высокоочищенной аденилаткиназы из *E. coli*. Фермент из 50 г бактериального экстракта сорбировали на большую колонку «Blue-Sepharose CL-6B», элюировали раствором, содержащим по 1 мМ АМР и АТР (очистка в 25 раз), затем освобождались от аденозинфосфатов гель-фильтрацией и снова сорбировали белок на маленькую (2—5 мл) колонку голубой сефарозы. На этот раз элюцию вели 50 мМ раствором специфического ингибитора аденилаткиназы — P^1, P^5 -ди(аденозин-5')пентафосфата [Bârzu, Michelson, 1983].

Ввиду его простоты и дешевизны значительно чаще использу-

ется второй из названных подходов — неспецифическая элюция. Здесь в распоряжении эксперимента имеется довольно обширный арсенал средств, ослабляющих прочность биоспецифического комплекса. Имея в виду сделанные выше замечания, не приходится удивляться тому, что в этот арсенал входят те же средства, что и для предотвращения неспецифической сорбции: увеличение ионной силы раствора, изменение pH, введение мочевины, гуанидинхлорида, детергентов, органических растворителей, удаление двухвалентных ионов, повышение температуры. Разница лишь в выборе соответствующих агентов и их концентрации, которая здесь должна быть достаточной для того, чтобы преодолеть кооперативный эффект действия сил аффинного средства. Для стационарного варианта хроматографической элюции это преодоление опять-таки должно быть полным, а для динамического — частичным. В последнем варианте нередко используют градиентную элюцию с присущим ей преимуществом сужения зоны элюируемого вещества. Конкретные примеры различных вариантов неспецифической элюции приведены ниже, а сейчас отметим, что зачастую удается ограничиться сравнительно мягкими воздействиями: менее 1 М NaCl, 4—6 М мочевина, изменение pH в пределах 4—10, менее 1% неионного детергента, около 10% диоксана или до 50% этиленгликоля. Однако в случае сильного аффинного средства ($K_L < 10^{-6}$ М) этого может быть недостаточно, и приходится использовать гуанидинхлорид или хаотропные агенты, например тиоцианат калия.

В этом, да и во всех остальных случаях неспецифической элюции, экспериментатор не должен упускать из поля зрения возможности необратимой денатурации очищаемого белка или белкового лиганда. Нередко приходится искать компромисс между эффективностью элюции и опасностью такой денатурации. По этой причине элюированный с колонки препарат следует немедленно путем диализа или гель-фильтрации перевести в подходящий буфер, а сорбент — промыть. Выяснение эффективности того или иного метода неспецифической элюции можно провести, как обычно, с помощью предварительных опытов в пробирках. Опасность необратимой денатурации следует оценить, наблюдая динамику инактивации раствора вещества в элюенте. Эта оценка должна предшествовать выяснению эффективности элюции, если наличие вещества в элюенте выявляется по его биологической активности.

Что касается опасности денатурации, то динамическая хроматография обычно выгоднее статической, так как возможность довольствоваться частичной десорбцией вещества с сорбента (в условиях равновесия) позволяет использовать меньшие концентрации диссоциирующих агентов. Вместе с тем не следует забывать, что в отношении продолжительности процесса элюции преимущество всегда за статическим вариантом, а это иногда может оказаться решающим.

Впрочем, в вопросе о продолжительности элюции следует проявлять известную осторожность, особенно когда речь идет об очистке белков или других макромолекул. Выше при рассмотрении

вопроса о посадке вещества на сорбент мы обращали внимание на то, что скорость этого процесса лимитируется затрудненной диффузией макромолекул в порах геля. То же самое справедливо и для их элюции. Десорбция и установление равновесия концентраций десорбированного вещества внутри гранул и в подвижной фазе колонки требуют иной раз значительного времени. Это тем более верно в случае особо прочной сорбции вещества на лиганде, когда процессы его вытеснения конкурирующим агентом или разрыва кооперативных связей идут медленно. Поэтому нередко даже при статической элюции вещества с короткой и широкой колонки приходится сильно снижать скорость элюции, а иногда и задерживать ее начало вплоть до 2—3 ч после заполнения колонки элюентом.

ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

Приемы, используемые в аффинной хроматографии, в основном те же, что и в других рассмотренных выше методах, поэтому достаточно будет остановиться лишь на некоторых отличительных особенностях. Уже упоминалось, что в большинстве случаев решается задача аффинной очистки одного вещества, сила связывания которого на сорбенте намного превосходит силы неспецифической сорбции других компонентов исходной смеси. Это позволяет эффективно использовать аффинную хроматографию и на ранних стадиях очистки вещества. Передко на этой стадии в препарате могут содержаться выпавшие в осадок белки или липопротеиды, способные «забивать» колонку. В таком случае следует элюцию вести в свободном объеме, промывая сорбент на фильтре (с периодическим перемешиванием). Заметим, что промывку сорбента в объеме выгоднее вести несколько раз небольшими порциями элюента, чем сразу большим его объемом. Аффинная хроматография в свободном объеме удобнее, чем колоночная, и в том случае, когда нужный белок очень мало представлен в неочищенном экстракте, но хорошо связывается сорбентом. Хроматография в объеме позволяет использовать такую концентрацию суммарного белка в экстракте, с которой из-за вязкости было бы трудно работать на колонке. Аффинная сорбция в объеме широко используется в радиомунных методах исследования.

Об особенностях проведения эксперимента в наиболее распространенном варианте статической хроматографии на короткой и широкой колонке было достаточно сказано выше. Подчеркнем еще раз необходимость ограничивать скорость течения жидкости по колонке. Для веществ, относительно слабо связывающихся с лигандом, критическим этапом является посадка вещества на сорбент, а для сильно связывающихся — их элюция. На этих этапах скорость течения не должна превышать 3—5 мл см²·ч, а иногда течение даже временно прекращают в интересах достижения полноты сорбции или десорбции.

Если колонка заполняется сорбентом до внесения препарата, то ее полезно промыть сначала 3—4 объемами буфера для посадки

вещества, затем 2—3 объемами раствора, которым будет осуществляться его элюция (в случае неспецифической элюции), и снова уравновесить посадочным буфером.

Вообще тщательную промывку аффинного сорбента перед его использованием, а особенно после длительного хранения следует предусмотреть в любом варианте аффинной хроматографии. Дело в том, что при хранении идет медленный гидролиз связей лигандов с матрицей, приводящий к освобождению, или «подтеканию», лигандов («leakage», «bleeding»). Это явление опасно не уменьшением емкости сорбента (на доли процента), а тем, что перешедшие в раствор молекулы лиганда могут оказаться на два-три порядка более активными в отношении связывания вещества, чем иммобилизованные молекулы. Это создает ситуацию конкурентной элюции в тот момент, когда должна происходить посадка вещества на сорбент. Результатом такой ситуации может оказаться заметное уменьшение и даже полное отсутствие задержания вещества на сорбенте. Подтекание лигандов может происходить не только за счет отрыва их ковалентно связанных молекул от матрицы, но и в результате постепенной десорбции тех молекул лиганда, которые не были отмыты после посадки его на матрицу.

Если по указанным причинам приходится использовать динамический вариант аффинной хроматографии, то объем колонки, как уже упоминалось, берут из такого расчета, чтобы объем препарата составлял не более 5% от него, а соотношение высоты колонки к ее диаметру — в пределах от 20 : 1 до 50 : 1. Использование элюции градиентом концентрации одного из перечисленных десорбирующих агентов улучшает качество фракционирования за счет сужения зон элюции (см. гл. 1). Крутизна градиента (объем элюции) выбирается эмпирически — по характеру разрешения зон фракционируемых веществ или отделения зоны вещества от примесей.

Если элюент дорог (при конкурентной элюции), а выбрана относительно длинная колонка, то можно воспользоваться «импульсной элюцией»: подать на верхнюю часть колонки, где сорбировано вещество, относительно небольшой объем такого элюента, заведомо снимающий вещество с сорбента, а затем продолжить элюцию уже буфером.

По окончании элюции вещество следует перевести в нейтральный буфер, а колонку — регенерировать. С этой целью ее можно промыть 10 объемами щелочного буфера и таким же количеством кислого (рН 8,5 и 4,5), добавив в каждый из них 0,5—1 М NaCl, после чего уравновесить посадочным буфером. Иногда от засорения колонки приходится избавляться более решительными мерами: промывкой 2 М раствором KCl с 6 М мочевиной или даже инкубацией в течение ночи в растворе проназы (разумеется, если лиганды не имеют белковой природы).

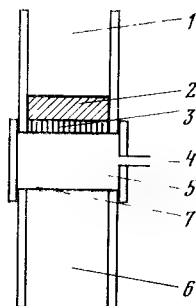
Лифофилизированные продажные сорбенты можно хранить на холоду, в том числе и при отрицательных температурах. Суспензии сорбентов следует хранить на холоду без замораживания, с добавлением обычных бактериостатических агентов.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ЭЛЮЦИЯ

Иногда десорбция вещества с аффинного сорбента идет с трудом, препарат сильно разбавляется и имеется опасность его денатурации. В таких случаях бывает целесообразно пойти на некоторое усложнение эксперимента и вместо «вымывания» из колонки десорбируемого вещества добиваться его удаления за счет электрического поля, т. е. сочетать элюцию с аффинного сорбента с электрофорезом.

Рис. 135. Простое устройство для десорбции вещества с аффинного сорбента методом электрофореза [Morgan et al., 1979]

- 1 — верхний электродный буфер;
- 2 — аффинный сорбент с веществом;
- 3 — мембрана из пористого полипропилена;
- 4 — выход из камеры элюции;
- 5 — камера элюции;
- 6 — нижний электродный буфер;
- 7 — диализная мембрана



На рис. 135 показана схема простого устройства, предложенного для этой цели Морганом и соавторами. Сорбент с сорбированным на нем веществом они вносили тонким слоем на мембрану из пористого полипропилена, отделяющую его от камеры элюции, которая, в свою очередь, диализной мембраной была отделена от нижнего электродного буфера. Объем камеры элюции можно было регулировать, сближая верхнюю и нижнюю трубки. Верхний электродный буфер, которым уравнивали и сорбент, выбирали таким образом, чтобы десорбируемый белок был должным образом заряжен. Работа этой системы не требует особых пояснений. Главное ее достоинство — малый объем, куда элюируется вещество с колонки. Разумеется, примеси необходимо десорбировать и смыть с колонки до ее установки в камеру элюции. Тем не менее часть задержавшихся на колонке примесных белков может выходить в камеру вместе с очищаемым белком [Morgan et al., 1979].

Чтобы отделить их друг от друга, в последующем варианте того же устройства Морган и соавторы электрофоретическую элюцию вели не в жидкость, а в слой 7,5%-ного ПААГ. В ходе миграции через этот слой элюат подвергался электрофоретическому фракционированию, и в камеру элюции, находившуюся под ПААГ, можно было собирать чистое вещество [Morgan et al., 1980]. Аналогичный вариант электрофоретической элюции был использован другими авторами [Kinsaid, Vaughan, 1979]. Описано применение электрофоретической элюции для удаления неспецифически, но прочно сорбирующегося на матрице постороннего белка — гемоглобина, мешающего препаративной очистке ангидразы угольной кислоты [Bergenhem et al., 1983].

АФФИННАЯ ЖХВД

Выше отмечалось, что аффинное взаимодействие вещества с лигандом требует значительного времени, поэтому скорость подачи вещества на колонку или его элюции приходится снижать или даже на время приостанавливать соответствующий процесс. Ввиду этого целесообразность использования здесь ЖХВД, главным преимуществом которой является скорость фракционирования, представляется сомнительной. Тем не менее в печати иногда появляются сообщения об экспериментах такого рода. Так, недавно было описано фракционирование нуклеозидов и аналогов АМР на колонке, заполненной глицерилпропилсиликагелем (на базе «LiChrospher Si1000»), на котором с помощью трезилхлорида в качестве лиганда был закреплен фермент алкогольдегидрогеназа [Nillson, Larsson, 1983]. В другой работе на основе такой же силикагелевой матрицы описано получение и использование аффинного сорбента, несущего в качестве лиганда фенолборную кислоту [Hagemeyer et al., 1983].

ИЗБРАННЫЕ ПРИМЕРЫ

Для иллюстрации изложенных в предыдущем разделе общих соображений и возможностей использования различных аффинных сорбентов рассмотрим определенное число примеров, отобранных из периодической научной литературы последних трех лет. Большая их часть относится к очистке ферментов клеточного метаболизма (и отдельно — белков, регулирующих активность нуклеиновых кислот). Далее будут приведены примеры аффинного фракционирования и очистки самих нуклеиновых кислот, в том числе на иммуносорбентах. Основное внимание уделим более простому и универсальному методу — неспецифической элюции, однако биоспецифическая аффинная элюция белков тоже будет представлена несколькими типичными примерами. Рассмотрение начнем с использования сорбентов с индивидуальной специфичностью, ограничившись здесь тремя примерами, поскольку нет смысла пытаться сколько-нибудь полно иллюстрировать бесчисленное разнообразие возможных сорбентов этого типа. Аффинная хроматография белков клеточного метаболизма на сорбентах с групповой специфичностью будет иллюстрирована подробнее, а затем последуют два примера использования ковалентной хроматографии.

ОЧИСТКА ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Сорбенты с индивидуальной специфичностью

Пример 1. Очистка карбоксипептидазы А из скелетной мышцы крысы [Bodwell, Meyer, 1981]. Выделенный из картофеля специфический белковый ингибитор карбоксипептидазы А присоединяли к BrCN-активированной сефарозе 4В в концентрации 1 мг на

1 мл сорбента. Для дополнительной очистки от примесных белков, несущих SH-группы и способных задерживаться на основной колонке (по-видимому, других карбоксипептидаз), вводили предколонку, заполненную «Affi-Gel 501». На этот «тандем» колонок (объемом 10 и 1,5 мл) в 2 М растворе NaCl, содержащем 5 мМ HEPES-буфера, pH 7,5, вносили фракцию гомогената мышц, экстрагированную между 0,4 М KCl и 2 М NaCl и дополнительно очищенную осаждением сульфатом аммония. Колонки промывали 30 мл того же раствора, затем колонку «Affi-Gel 501» отъединяли, а карбоксипептидазу А элюировали с аффинного сорбента 2 М раствором NaCl в 0,01 М Na_2CO_3 (pH 11,2), т. е. за счет сильного защелачивания элюента. Примесные белки (кроме тех, которые остались на «Affi-Gel 501») выходили при промывке, а фермент элюировался острым пиком после резкой смены pH буфера (рис. 136). Выходящий из колонки фермент немедленно переводили в нейтральную среду, для чего фракции собирали прямо в пробирки, содержавшие 2 М раствор NaCl в 1 М HEPES-буфере (pH 7,5) из расчета 50 мкл на 1 мл элюата. Высокая концентрация соли обеспечивала растворимость фермента и препятствовала неспецифической адсорбции.

Для сопоставления и иллюстрации аналитических возможностей аффинной хроматографии упомянем работу, в которой изучалось влияние различных модификаций того же фермента (ацетилирования, азотирования, избирательной модификации аминокислот и др.) на его биологическую специфичность. В качестве лиганда использовали бензилянтарную кислоту — мощный и обратимый ингибитор карбоксипептидазы А. *n*-Амино-*DL*-бензилянтарную кислоту через аминогруппу присоединяли к активированному сорбенту типа «CN-activated Sepharose 4B». Фермент сажали в MES-буфере (pH 6), а элюировали *Трис*-HCl, pH 7 (с добавлением высокой концентрации NaCl в оба буфера). При pH 7 фермент вымывался с колонки медленно, в большом объеме элюента. В том, что он связан с сорбентом своим активным центром, можно убедиться, наблюдая эффект добавления в элюент бензилянтарной кислоты (конкурентная элюция; рис. 137). Снятие с колонки модифицированных вариантов фермента (без добавления кислоты в элюент) в ряде случаев происходило намного легче, чем исходной карбоксипептидазы А, что позволяет судить о трансформациях ее биологической специфичности [Cueni et al., 1980].

Пример 2. Очистка цитоплазматической казеинкиназы 1 из печени крысы [Pierre, Loeb, 1982]. Эта «кислая» киназа способна фосфорилировать кислые белки — казеин и фосфотин; щелочные белки она не фосфорилирует, и биологическая роль ее неясна.

Фермент экстрагировали из микросомальной фракции клеток печени между 0,15 и 0,85 М KCl. Аффинный сорбент индивидуальной специфичности получали путем связывания фосфитина на BrCN-активированной сефарозе в 0,1 М NaHCO_3 (pH 8,3) с 0,5 М NaCl в соотношении 10 мг белка на 1 мл матрицы. Сорбент промывали дважды следующей последовательностью растворов: 0,1 М NaHCO_3 (pH 8,3) — 0,5 М NaCl — 0,1 М Na-ацетат (pH 4) — 0,5 М NaCl, а затем уравнивали 0,15 М раствором NaCl с 0,05 М *Трис*-HCl (pH 7,5) и 2 мМ MgCl_2 в колонке размером 0,4 × 6 см. Частично очищенную гель-филь-

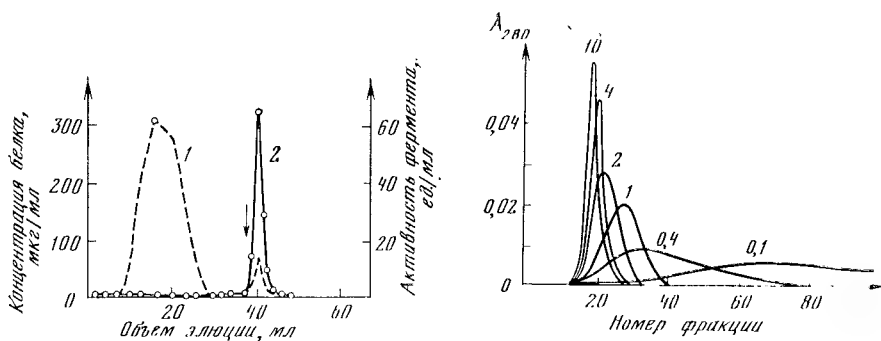


Рис. 136. Очистка карбоксипептидазы А из скелетной мышцы крысы [Bodwell, Meyer, 1981]

1 — концентрация белка; 2 — активность фермента

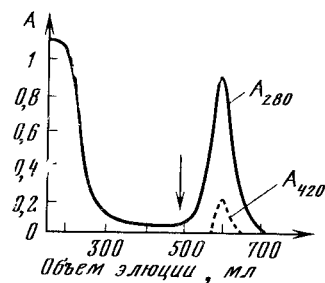
Рис. 137. Аффинная хроматография карбоксипептидазы А на связанной с сефарозой бензилантарной кислоте с конкурентной элюцией различными концентрациями свободного лиганда [Cueni et al., 1980]

Цифры у кривых — концентрация кислоты в элюенте, мМ

Рис. 138. Очистка гаптоглобина из плазмы аффинной хроматографией на гемоглобин-сефарозе [Delers et al., 1981]

Стрелкой отмечен момент начала элюции 8М раствором мочевины

трацией на «Ultrogel AcA 34» и ионообменной хроматографией на СМ-сефадексе казеинкиназу 1 сажали на колонку в том же растворе, им же промывали и элюировали, ступенчато повышая (по 25 мл) концентрацию NaCl (0,25—0,4—0,6 М). Собирали активные фракции по 2 мл.



Таким образом, здесь неспецифическая элюция осуществлялась повышением ионной силы элюента.

Пример 3. Очистка гаптоглобина из эритроцитов цыпленка [Delers et al., 1981]. Гаптоглобин — белок плазмы крови, связывающий гемоглобин. Его очистку вели на аффинном сорбенте, представлявшем собой сефарозу с иммобилизованным на ней гемоглобином.

«Sephарозе CL-4В» активировали окислением в 0,2 М NaIO₄ в течение часа в темноте. Для связывания с окисленной сефарозой гемоглобин переводили в форму цианметгемоглобина действием феррицианида и цианистого калия. Ковалентное связывание в присутствии NaBH₄ проходило нацело — до концентрации 5 мг на 1 мл сорбента. 100 мл плазмы крови, содержащей до 2 мг/мл гаптоглобина, смешивали с 2 мл 1 М NaCl вносили на колонку (50 мл) гемоглобин-сефарозы, выдерживали 30 мин для завершения аффинной сорбции и промывали 0,15 М раствором NaCl в 0,05 М Трис-НCl (pH 7) до прозрачности элюата при 280 нм. Гаптоглобин элюировали тем же буфером, но с добавлением до 8 М мочевины (рис. 138).

Этот пример интересен тем, что для элюции применяли агент, способствующий разрыву водородных связей, которые, по-види-

мому, доминируют во взаимодействии гаптоглобина с гемоглобином.

Пример 4. Очистка некоторых мембранных белков на иммуносорбенте [Schneider et al., 1982].

Очищали общий антиген острой лейкемии из лимфобластов, антиген HLA-B и рецепторы трансферрина. Моноклональные антитела для этих антигенов сажали на «Protein A-Sepharose CL-4B» (по белку А) и сшивали действием диметилпимелидита. Такая фиксация антител значительно выгоднее, чем на BrCN-активированной сефарозе, так как она происходит по участкам F_c и области связывания антигенов заведомо остаются свободными. Сшивка бифункциональным агентом фиксирует ориентацию антител. Оказалось, что максимальное связывание антигенов достигается при закреплении на матрице примерно 50% от наибольшего количества антител, насыщающего ее емкость. Для удаления материала, неспецифически сорбирующегося на белке А, клеточные лизаты предварительно инкубировали с бактериями, несущими на своей поверхности этот белок (*Staph. aureus*), которые затем удаляли центрифугированием.

Для синтеза иммуносорбента «Protein A-Sepharose CL-4B» смешивали с антителами в 0,1 М боратном буфере (рН 8,2) и осторожно встряхивали 30 мин при комнатной температуре. Затем сорбент промывали буфером (0,2 М раствор триэтанолamina, рН 8,2), суспендировали в 20 объемах 0,01—0,08 М раствора диметилпимелидидгидрохлорида (фирмы «Pierce») в таком же буфере и выдерживали 45 мин при комнатной температуре. Далее следовали промывки готового сорбента этаноламином и боратным буфером. Посадку антигенов из клеточного лизата (обработанного, как указано выше) вели в течение 2 ч на холоду. Промывали иммуносорбент растворами соли и детергентов. Антигены элюировали 0,05 М диэтиламином (рН 11,5) в присутствии 0,5% дезоксихолата.

Сорбенты с групповой специфичностью

Пример 5. Очистка гуанилатциклазы из легкого крысы [Garbers, 1979].

Очистку вели на GTP-сефарозе. На матрицу BrCN-активированной сефарозы 4В в качестве спейсера при рН 9,5 присоединяли дигидразид адипиновой кислоты (его можно получить кипячением диэтилового эфира адипиновой кислоты с гидразингидратом в этаноле). Рибозу GTP окисляли периодатом натрия, а окисленный GTP присоединяли к гидразид-сефарозе в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 5) из расчета 5 мкмоль GTP на 1 мл матрицы. Колонку (2,6×20 см) уравнивали 0,025 М триэтанолamiновым буфером (рН 7,6), содержащим по 10 мМ ДТТ и NaN₃ и 1 мМ MnCl₂. 7 г белка, осажденного при рН 5 из гомогената легкого, растворяли в 800 мл того же буфера и пропускали через колонку, которую затем промывали еще 4 л буфера. Фосфодиэстеразы циклических GMP и AMP из колонки вымывались, а гуанилатциклаза оставалась в комплексе с иммобилизованным GTP. Элюцию фермента с колонки вели тем же буфером, но с заменой MnCl₂ на 0,5 мМ ЭДТА.

Это — неспецифическая элюция путем удаления ионов металла, необходимых для существования аффинного комплекса.

Пример 6. Очистка белка-ингибитора аденилатциклазы и циклонуклеотидфосфодиэстеразы из мозга быка [Wallace et al., 1979]. Клеточный уровень содержания cAMP регулируется актив-

постью двух ферментов: аденилатциклазы, ведущей синтез сАМР из АТР, и циклонуклеотидфосфодиэстеразы, гидролизующей сАМР до 5'-АМР. Активность обоих ферментов стимулируется кальмодулином — активатором белковой природы, зависящим от присутствия ионов Ca^{2+} . Кроме того, их активность регулирует белок-ингибитор, по-видимому, блокирующий кальмодулин путем образования с ним Ca^{2+} -зависимого комплекса. В данной работе авторы тонко манипулировали содержанием ионов Ca^{2+} с целью очистки этого ингибитора.

Сначала экстракт из 250 г мозга быка в буфере, не содержащем Ca^{2+} (0,05 М Трис- HCl , pH 7,8, +3 мМ MgSO_4 + 1 мМ ДТТ + 1 мМ ЭДТА), вносили на колонку «Affi-Gel Blue» (3,2×46 см) и промывали ее тем же буфером. Кальмодулин вымывался из этой колонки, а ингибитор на ней задерживался. Его элюировали 0,2 М раствором NaCl в буфере. Для дальнейшей очистки ингибитора на активированных спейсерах сорбента «Affi-Gel 10» фиксировали предварительно очищенный кальмодулин. Полученный сорбент вносили в объединенные фракции элюата с «Affi-Gel Blue», содержавшие ингибитор, и добавляли туда CaCl_2 до концентрации 1,5 мМ. Суспензию осторожно перемешивали в течение ночи и переносили в колонку (2,5×10 см), которую промывали тем же буфером, но с заменой ЭДТА на 0,1 мМ CaCl_2 . В присутствии Ca^{2+} ингибитор удерживался на колонке в комплексе с кальмодулином, а смеси вымывались тем же раствором. Очищенный ингибитор элюировали снова исходным буфером, содержащим ЭДТА вместо CaCl_2 .

Пример 7. Очистка интерферона человека на «Blue Sepharose CL-6B» [Knight, Fahey, 1981]. Помимо объекта очистки и используемого лиганда, этот пример интересен тем, что здесь неспецифическая элюция осуществлялась за счет снижения полярности элюента путем введения в него этиленгликоля (ЭГ).

Продукцию интерферона индуцировали в культуре клеток фибробластов человека. В 10—15 л клеточного экстракта добавляли NaCl (до 1 М) и вносили на колонку «Blue Sepharose» (2,5 × 10 см), уравновешенную 1 М раствором NaCl в 0,02 М Na -фосфатном буфере (pH 7,2), со скоростью 200 мл/ч. Соль здесь, очевидно, служила для подавления сорбции других белков экстракта.

Интерферон, обладая сродством к красителю «Cibacron Blue F3GA», задерживался на колонке. Ее промывали 1 л солевого раствора, потом солевым раствором с добавлением до 30% ЭГ и элюировали 50%-ным раствором ЭГ (рис. 139, а). Фракции по 12 мл собирали в пробирки, уже содержавшие по 6 мл солевого раствора без ЭГ, с тем чтобы концентрацию последнего во фракциях снизить до 37%, поскольку в 50%-ном ЭГ интерферон не очень устойчив.

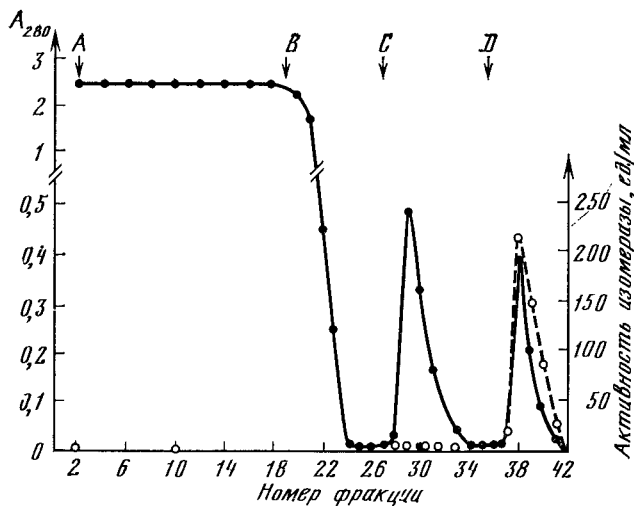
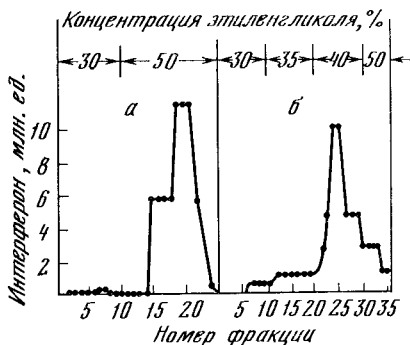
Для концентрирования и дополнительной очистки фракции 15—23 с «большой» колонки разбавляли до 25% по ЭГ и вносили на «малую» колонку «Blue Sepharose CL-6B» (0,8 × 5 см), уравновешенную 2 М раствором NaCl в том же фосфатном буфере. Промывку и элюцию производили сначала тем же крепким солевым раствором (100 мл), а затем ступенями (по 10 мл) возрастающей концентрации ЭГ в том же растворе (рис. 139, б). Концентрированный раствор очищенного интерферона элюировали 40%-ным ЭГ.

Описано также фракционирование интерферона человека аффинной хроматографией на конканавалин А-сефарозе. При этом обна-

Рис. 139. Очистка интерферона человека на «Blue Sepharose CL-6B» с элюцией этиленгликолем [Knight, Fahey, 1981]

Рис. 140. Очистка β -оксидеканоилтизоэфирдегидразы (изомеразы) на «Blue Sepharose CL-6B» [Flick, 1981]

A — внесение препарата;
B — начало промывки буфером;
C — элюция 1 M NaCl;
D — элюция 1 M KSCN;
сплошная линия — A_{280} ;
пунктир — активность фермента



ружилась гетерогенность интерферона, полученного из лейкоцитов. Большая его часть ($M = 16\,000$) на колонку «Con A-Sepharose» (фирмы «Pharmacia») в буфере с 0,15 M NaCl не сорбировалась. Другая же часть сорбировалась так прочно, что не снималась даже 1 M NaCl; ее элюировали 0,1 M раствором метилманнозида. Анализ показал, что эта фракция интерферона ($M = 21\,000$) гликозилирована. Наконец, малая доля исходной активности интерферона элюировалась с колонки только 70%-ным раствором этиленгликоля. Иммунологические тесты показали, что в ней содержался интерферон «фибробластной» природы [Grob, Chadha, 1979].

Пример 8. Очистка дегидратазы, участвующей в синтезе ненасыщенных жирных кислот из *E. coli* [Flick, 1981].

На этом примере можно познакомиться с использованием хаотропного агента для неспецифической элюции фермента с того же самого сорбента — «Blue Sepharose CL-6B». С действием хаотропных агентов, разрушающих воду и тем самым уменьшающих силу гидрофобных связей, мы познакомимся в гл. 5. Объектом очистки

здесь служила одна из дегидратаз, участвующих в синтезе ненасыщенных жирных кислот, а в качестве хаотропного агента использовали тиоцианат калия. 25 мл частично очищенного экстракта из *E. coli* вносили на колонку голубой сефарозы ($1 \times 7,5$ см), уравновешенную 0,05 М К-фосфатным буфером (рН 7), промывали тем же буфером до прозрачности элюата ($A_{280} = 0$), а неспецифически сорбированные белки снимали 1 М раствором NaCl. Затем элюировали фермент 1 М раствором KSCN в том же буфере (рис. 140).

Пример 9. Очистка белковой фосфатазы из скелетных мышц кролика [Vandenhede et al., 1981]. После предварительной очистки экстракта из мышц ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-сефадексе А-50 и гель-фильтрацией на ультрагеле АсА 34 раствор фермента в 0,02 М Трис-HCl (рН 7) с 0,5 мМ ДТТ сорбировали двукратным пропусканием через колонку (12×1 см) полилизин-сефарозы 4В. После промывки 0,2 М раствором NaCl в том же буфере для неспецифической элюции фермента использовали линейный градиент (150 мл) 0,2—0,6 М NaCl. При этом выходили четкие пики активности фермента.

Пример 10. Очистка цитохром-с-оксидазы из митохондрий печени крысы [Rascati, Parsons, 1979]. Нередко при очистке ферментов и белков мембранного происхождения для поддержания их растворимости (и активности) в растворы для посадки и элюции белка вводят неионные детергенты. Так, при аффинной хроматографии с использованием той же полилизин-сефарозы на заключительном этапе очистки цитохром-с-оксидазы в 0,02 М Na-фосфатный буфер (рН 7) для посадки фермента и в 0,16 М буфер, которым вели его элюцию, добавляли до 0,1 % Тритона X-100. В этой же работе на раннем этапе выделения фермент очищали аффинной хроматографией на сорбенте с индивидуальной специфичностью — иммобилизованном на сефарозе цитохроме *c*. При этом фермент сорбировали и промывали 1%-ным раствором неионного детергента «Твеп-80», а элюировали 1%-ным раствором Тритона X-100 (в обоих случаях Na-фосфатный буфер с рН 7, 0,2 и 0,1 М соответственно). Таким образом, неспецифическая элюция осуществлялась сменой детергента. Можно предположить, что это было обусловлено различной степенью родства двух детергентов к ферменту. Напомним, что в молекуле Тритона X-100 есть ароматическое кольцо, а в молекуле «Твеп-80» его нет.

Своеобразный прием очистки цитохром *c*-оксидазы из дрожжей недавно описали Алци и соавторы. Цитохром *c* они ковалентно связывали с «Thiol-Sepharose 4В». Незанятые группы сорбента блокировали обработкой 1 мМ раствором β-меркаптоэтанола при рН 4,5 (кислая среда препятствует снятию цитохрома *c*). Затем цитохромоксидазу сажали на этот аффинный сорбент в 0,05 М Трис-HCl (рН 7,2) с добавлением до 1 % Тритона X-100, промывали тем же раствором и элюировали линейным градиентом 0—0,175 М NaCl. Вначале выходила цитохром *c*-оксидаза, а за ней и цитохром *c*-редуктаза [Azzì et al., 1982].

Нередко в ходе очистки фермента используют последовательно

аффинные сорбенты с групповой и индивидуальной специфичностью. Например, новую протеинкиназу из ядер печени с $M = 105\,000$ очищали сначала на продажной полилизин-агарозе, а затем на сорбенте, полученном закреплением ингибитора этой киназы на BrCN -активированной сеферозе 4В. Элюция в обоих случаях была неспецифической (солевым раствором) [Sikorska, Whitfield, 1982].

Ковалентная хроматография

Пример 11. Ковалентная хроматография тиол-содержащих белков из печени быка [Hillson, 1981]. Прочность дисульфидных мостиков, образуемых различными тиол-содержащими белками с SH-группами сорбента, неодинакова — она зависит от конформации белка и микроокружения тиоловых групп. Это позволяет фракционировать такие белки динамической ковалентной хроматографией. Тиоцпропил-сефарозу в дисульфидной форме (с защитой и активацией, матричного тиола 2-тиопиридином) суспендировали в буфере следующего состава: 0,05 М Трис-HCl (pH 7,5) + 25 mM KCl + 0,1 М NaCl + 5 mM MgCl_2 + 1,25 mM ЭДТА. Суммарный белковый препарат (10 мг/мл) инкубировали 30 мин при 30° в том же буфере, но с добавлением 0,1 mM ДТТ. В этих условиях (мягкое восстановление) SH-группы белков освобождаются из случайных комплексов, но внутримолекулярные дисульфидные мостики остаются интактными. Затем ДТТ удаляли гель-фильтрацией, белковый препарат в свободном объеме добавляли к суспензии сорбента (2—3 мг белка на 1 мл), осторожно встряхивали ее 16 ч при 25°, вносили в колонку и промывали тем же буфером (без ДТТ). Элюцию вели тремя ступенями, увеличивая восстанавливающую силу элюента: 20 mM *L*-цистеин — 50 mM глутатион — 20 mM ДТТ. На каждой ступени в колонку вводили объем элюента, равный свободному объему колонки, выдерживали в течение 30 мин при 30°, после чего начинали собственно элюцию, которую вели (при 4°) до полного выхода белка. Затем колонку промывали буфером и аналогично обрабатывали следующим элюентом. В собранные белковые фракции для восстановления смешанных дисульфидов между белками и элюентом вносили до 5 mM ДТТ, инкубировали 30 мин при 25° и на холоду диализовали против буфера без ДТТ.

В качестве типичного примера использования «Activated Thiol-Sepharose» можно привести заключительный этап 5-стадийной хроматографической очистки орнитиндекарбоксилазы из печени теленка [Haddox, Russel, 1981]. Белок сажали прямо на маленькую колонку тиолсефарозы (0,6 × 3,5 см), уравновешенную 0,1 М NaCl с 0,1% ПЭГ и 0,1 mM ЭДТА, со скоростью 0,2 мл/мин (около 40 мл/см²·ч) и элюировали линейным градиентом концентрации ДТТ (0,002—0,25 М; объем 15 мл) в том же буфере.

Пример 12. Использование ртутноорганического производного агарозы («Affi-Gel 501») для извлечения тiorфосфорилированных гистонов [Sun, Allfrey, 1982a]. Для исследования фосфорилирования гистонов *in vivo* в клетках HeLa можно путем введения в питатель-

ную среду [^{35}S]-тиофосфата натрия заставить клеточные киназы сначала включить тиофосфат в γ -положение АТР и ГТР, а затем использовать его для тиофосфорилирования гистонов. Входящая в состав тиоэфиров сера сохраняет свое сродство к ртути, поэтому немодифицированные гистоны удается отобрать фиксацией на «Affi-Gel 501», а затем элюировать 10 мМ ДТТ.

Модифицированные таким же образом дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, как оказалось, успешно выступают в качестве предшественников при синтезе ДНК *in vivo*. Это позволило тем же авторам разработать метод очистки новосинтезированной вирусной ДНК из культуры зараженных вирусом SV-40 клеток почки зеленой обезьяны. Метку по ^{35}S в эту ДНК вводили из питательной среды с помощью $\text{Na}_2^{35}\text{SPO}_3$. После предварительной очистки ДНК фракционировали, как описано выше, на колонке «Affi-Gel 501». ДНК клетки-хозяина на колонке не задерживалась, а новосинтезированная вирусная ДНК сорбировалась и затем элюировалась 10 мМ ДТТ [Sun, Allfrey, 1982b].

БЕЛКИ, СВЯЗАННЫЕ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Белки, регулирующие матричную активность, осуществляющие репликацию, транскрипцию и трансляцию НК, а также их репарацию и процессинг, являются сейчас объектом столь многочисленных исследований, что это оправдывает выделение методов их очистки и фракционирования методом аффинной хроматографии в отдельный раздел.

В большинстве случаев в качестве лигандов для этой цели используют триазиновый краситель «Cibacron Blue F3GA», гепарин и иммобилизованные нуклеиновые кислоты или олигонуклеотиды. Рассмотрим несколько примеров каждого из этих вариантов.

Сорбенты с триазиновыми красителями

Пример 1. Очистка ДНК-лигазы фага T4 [Sugiura, 1980].
ДНК-лигазу фага T4 выделяли из зараженных клеток *E. coli*, очищали предварительно гель-фильтрацией на сефадексе G-100, а затем диализовали против буфера следующего состава: 0,02 М Трис-HCl (pH 7,5) + 1 мМ β -меркаптоэтанол + 0,1 мМ ЭДТА + 5% глицерина. «Blue Sepharose CL-6B» вымачивали в течение ночи в воде, заполняли ею баллончик шприца, служивший колонкой, промывали двумя объемами того же буфера, но с добавлением 2 М NaCl, а затем уравнивали буфером без соли. Препарат лигазы загружали на колонку, промывали буфером с 0,05 М NaCl и элюировали тем же буфером, но содержащим 0,4 М NaCl.

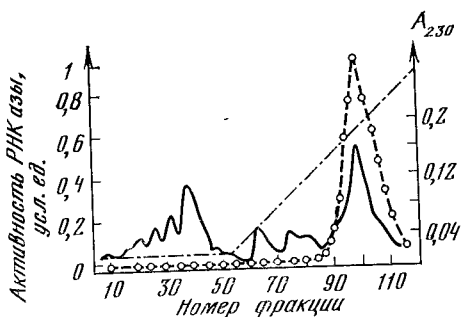
Из приведенной методики видно, что фермент не очень прочно связывался с красителем, поэтому автор воздержался от эффективных мер для удаления неспецифически сорбированного материала. Тем не менее электрофорез очищенного материала в ПААГ с ДДС-Na обнаруживал только одну полосу.

Поскольку, как указано выше, аффинная сорбция на триазиновых красителях обусловлена не каким-либо специальным свойством, а лишь стерическим соответствием конфигурации молекулы красителя строению и пространственной ориентации активного центра фермента, в каждом случае имеет смысл поискать такой краситель, у которого это соответствие окажется наилучшим.

Например, для гексокиназы из сердца свиньи наиболее подходящим для синтеза аффинного сорбента оказался красный монохлортриазиновый краситель «Procion brilliant red H-8BN». Его

Рис. 141. Очистка РНКазы D из *E. coli* на колонке «Affi-Gel Blue» с элюцией градиентом концентрации KCl [Cudny et al., 1981]

Сплошная линия — A_{230} ; пунктир — активность фермента



фиксировали на «Sephарозе 6В» в соотношении 1 мг на 1 мл сорбента. Белки из гомогената сердца экстрагировали и предварительно фракционировали на ДЭАЭ-целлюлозе, затем активные фракции объединяли, диализовали против 0,05 М Трис-НСl (рН 7,5) и вносили на сорбент. Примесные белки отмывали 4 М раствором мочевины, затем 2 М NaCl, а гексокиназу элюировали ее субстратом — 1,8 мМ раствором АТФ [Farmer, Easterby, 1982]. Очистку НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы из листьев гороха успешно проводили на продажном сорбенте — «красной сефарозе» («Red Sepharose CL-4В» фирмы «Pharmacia»), несущей краситель «Procion Red HE 3В» [Fickenscher, Scheibe, 1983].

Пример 2. Очистка РНКазы D из *E. coli* [Cudny et al., 1981]. Ведущая процессинг пре-тРНК РНКазы D также не очень прочно связывается с красителем. Тем не менее в этой работе были приняты меры по удалению неспецифически сорбированных примесей. Аффинная хроматография использовалась на заключительном этапе очистки — после двух стадий ионообменной хроматографии, очистки на оксипатите и гель-фильтрации. Препарат и колонку «Affi-Gel Blue» (0,6 × 12 см) уравнивали буфером следующего состава: 0,02 М Трис-НСl (рН 7,5) + 5 мМ MgCl₂ + 0,1 мМ ДТТ + 0,1 мМ ЭДТА + 0,1 мМ ФМСФ. Элюцию вели вогнутым градиентом с помощью трехкамерного смесителя (0; 0,15 и 0,5 М KCl в том же буфере). Как видно из рис. 141, пик активности фермента выходил после вымывания целого ряда примесных белков.

Пример 3. Очистка ДНК-полимеразы α из зародыша цыпленка [Yamaguchi et al., 1982]. Аффинной хроматографии здесь также предшествовали четыре стадии ионообменной хроматографии и гель-фильтрация. Сорбция фермента на голубой агарозе в этом

случае была заметно прочнее, что позволило промывать колонку с сорбированным на ней препаратом 0,15 М раствором KCl в буфере, а элюцию вести линейным градиентом 0,15—0,9 М KCl. ДНК-полимеразная активность выходила широким пиком; в ее последующей очистке использовалось еще три варианта аффинной хроматографии: на гепарин-сефарозе, ДНК-целлюлозе и олиго(dT)-целлюлозе.

Гепарин-сефароза

Благодаря сходству структуры своего лиганда со структурой РНК (гепарин является конкурентным ингибитором для РНКазы) гепарин-сефароза широко используется для очистки РНК-полимераз, обратной транскриптазы, факторов транскрипции и др.

Примеры 4—7. Очистка РНК-полимераз. Очистку РНК-полимеразы из *Bac. subtilis* начинали с аффинной хроматографии экстракта на колонке гепарин-сефарозы, синтезированной в лабораторных условиях [Davison et al., 1979]. При этом РНК-полимераза сразу отделялась от РНКазы, что облегчало ее обнаружение. Колонку размером $2,5 \times 20$ см, содержащую 0,3 мг гепарина на 1 мл сорбента, уравнивали буфером (0,01 М Трис-HCl, pH 8 + 10 mM MgCl₂ + 1 mM ЭДТА + 0,3 mM ДТТ + 7,5% глицерина), содержащим 0,05 М KCl, и вносили на нее осветленный центрифугированием экстракт из 50 г бактериальной массы в 150 мл того же буфера с добавлением ингибиторов протеаз. Основную массу белков удаляли промывкой буфером, а затем вели элюцию линейным градиентом 0,05—1 М KCl. Как видно из рис. 142, РНК-полимераза столь прочно садилась на гепарин, что выходила значительно позже всех прочих белков.

Ранее Штернбах и соавторы ступенчатой элюцией, комбинируя действие мочевины и соли, снимали РНК-полимеразу *E. coli* с колонки гепарин-сефарозы по субъединицам. 4 М мочевина в 0,01 М Трис-ацетатном буфере (pH 7,5), содержащем 10 mM (CH₃COO)₂Mg и 1 mM ДТТ, элюировала только α -субъединицу фермента; комбинация 4 М мочевины и 0,4 М NH₄Cl снимала с колонки β - и β' -субъединицы, а 6 М мочевина в сочетании с 1 М NaCl освобождала σ -субъединицу [Sternbach et al., 1975].

В последнее время для очистки и концентрирования РНК-полимераз на колонках гепарин-сефарозы часто используют сульфат аммония (СА). При стационарной хроматографии фермент сорбируют в присутствии 0,1—0,3 М СА и элюируют 0,5 М или 0,75 М раствором СА [Jaehning et al., 1977; Pflugfelder, Sonnenbichler, 1978; Guifoyle, 1980]. Для динамической хроматографии РНК-полимеразы на колонке гепарин-сефарозы (2,7 $\times$ 14 см) был использован линейный градиент 0,1—0,8 М СА [Ballario et al., 1980]. По-видимому, сульфат аммония стабилизирует фермент. В последних двух работах его вводили в различных концентрациях на всех этапах многостадийной очистки РНК-полимеразы.

Пример 8. Очистка обратной транскриптазы из вируса миелобластома птиц [Golomb, Grandgenett, 1979]. Обратная транс-

криптаза связывается с гепарином еще прочнее, чем РНК-полимераза. Аффинная хроматография на гепарин-сефарозе была использована в качестве заключительного этапа очистки этого фермента. Колонку объемом 1 мл уравнивали 0,1 М раствором NaCl в буфере, содержащем 0,05 М Трис-HCl (pH 7,5), 0,1 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ, 0,02 % NP-40 и 10 % глицерина. Последние два компонента буфера необходимы для сохранения активности фермента. На колонку загружали 650 мкг не полностью очищенного препарата и промывали от неспецифически сорбированных белков 0,23 М раствором NaCl в том же буфере. Элюцию вели линейным градиентом 0,23—1 М NaCl. ДНК-полимеразная и эндонуклеазная активности выходили вблизи концентрации 0,35 М NaCl. Обратная транскриптаза элюировалась значительно позже с хорошим выходом (более 90 %).

Пример 9. Очистка рестриктаз [Pirodda, Bickole, 1980]. Аффинная хроматография на гепарин-сефарозе рекомендована авторами в качестве основной процедуры для очистки различных рестриктаз. Рибосомы из бактериального лизата удаляли ультрацентрифугированием, а нуклеиновые кислоты — осаждением с помощью полиэтиленимина. Белковый препарат переводили в буферный раствор (0,02 М Трис-HCl, pH 7,5 + 0,5 мМ ЭДТА) и вносили на колонку гепарин-сефарозы, уравновешенной тем же буфером (объем колонки 20—25 мл на 100 г влажных клеток; соотношение длины к диаметру 5—10; скорость внесения препарата и элюции 0,5—1 свободный объем колонки в час). Элюировать рестриктазы можно линейным градиентом 0—0,8 М NaCl в 10 объемах колонки того же буфера. Авторы подробно описывают приготовление гепарин-сефарозы в лабораторных условиях.

Примеры 10—11. Очистка факторов белкового синтеза. Томас и соавторы подробно описали очистку девяти факторов инициации белкового синтеза из ретикулоцитов кролика [Thomas et al., 1979]. Очистка начиналась с пропускания пострибосомального супернатанта через колонку гепарин-сефарозы, на которой 90—95 % белков супернатанта не задерживаются, а факторы инициации садятся столь прочно, что после надлежащей промывки их снимают лишь 1 М KCl.

Фактор элонгации EF-1 из ретикулоцитов кролика после предварительного фракционирования супернатанта осаждением сульфатом аммония очищали на колонке гепарин-сефарозы сначала в статическом режиме. Элюцию вели 0,25 М раствором KCl в 0,02 М Трис-HCl (pH 7,5) с 2 мМ β-меркаптоэтанолом. Очистку на гепарин-

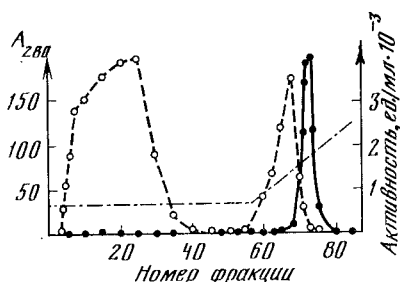


Рис. 142. Очистка РНК-полимеразы из *Bac. subtilis* на колонке гепарин-сефарозы с элюцией линейным градиентом KCl

Сплошная линия — активность фермента; пунктир — A_{280}

сефарозе использовали повторно, после дополнительной гель-фильтрации и хроматографии на оксиапатите, но на этот раз в динамическом варианте, с элюцией линейным градиентом 0,025—0,25 М KCl [Slobin, 1979].

Иммобилизованные нуклеиновые кислоты

Нуклеиновые кислоты в качестве лигандов широко используются для очистки белков. функционирование которых связано с образованием белково-нуклеиновых комплексов. Эти комплексы удерживаются в первую очередь действием электростатических сил, поэтому элюцию с таких сорбентов ведут повышением концентрации соли.

Пример 12. Очистка фактора элонгации eIF-2 из печени крысы на РНК-целлюлозе [Nygård et al., 1980].

Белки, снятые с рибосом промывкой 0,5 М KCl, фракционировали осаждением раствором сульфата аммония между 40 и 50% от насыщения, диализовали против буфера, содержавшего 0,1 М KCl, 0,02 М Трис-HCl (pH 7,6), 14 мМ β-меркаптоэтанола, 10% глицерина и 0,1 мМ ЭДТА, и вносили в колонку (10 × 1,5 см) с рибосомальной РНК из ретикулоцитов кролика, иммобилизованной на целлюлозе «Whatman CF-11» с помощью УФ-облучения. Колонку уравнивали и промывали тем же раствором. Элюцию вели линейным градиентом (200 мл) 0,1—0,5 М KCl в том же буфере со скоростью 1 мл/мин. Фактор eIF-2 выходил при концентрации соли около 0,32 М.

Примеры 13—16. Очистка белков на ДНК-целлюлозе. В приведенных ниже примерах аффинную хроматографию на ДНК, иммобилизованной на целлюлозе путем высушивания или с дополнительной пришивкой УФ-облучением, использовали для очистки «ДНК-узнающих» белков. При этом не предпринималось никаких усилий по отбору для иммобилизации каких-либо определенных участков ДНК; белки сами «находили» в гетерогенной популяции молекул ДНК участки своего биоспецифического связывания.

Например, на заключительном этапе очистки рестриктазы Eco RI использовали аффинную хроматографию на денатурированной ДНК спермы осетра, фиксированной на целлюлозе с помощью УФ-облучения. Колонку с сорбентом (2 × 14 см) уравнивали 0,1 М раствором NaCl в 0,02 М К-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 5 мМ β-меркаптоэтанола, 1 мМ ЭДТА и 10% глицерина. Препарат рестриктазы после четырех предшествующих стадий очистки диализовали против 0,2 М раствора NaCl в том же буфере, загружали на колонку со скоростью около 40 мл/см²·ч, промывали тем же раствором и элюировали ступенями (по 90 мл): 0,25—0,5—0,75 М NaCl. Рестриктазная активность выходила при 0,5 М NaCl [Rubin, Modrich, 1980]. Очистку ДНК-синапсаты E.coli на предпоследнем этапе вели в аналогичных условиях. Этот фермент связывается с ДНК менее прочно: возможна элюция линейным градиентом 0,01—0,3 М KCl [Potter, Dressler, 1980].

Аналогичную процедуру использовали для очистки ДНК-связывающего белка из клеток KB и HeLa, зараженных аденовирусом [Klein et al., 1979]. Лигандом служила однонитчатая тимусная ДНК. На колонку, уравнированную буфером, содержащим 0,15 М NaCl, с очень малой скоростью вносили осветленный (12 000 об/мин, 30 мин) лизат клеток. Промывали буфером с 0,3 М NaCl и элюировали белок линейным градиентом 0,3—1 М NaCl.

Аффинную хроматографию на ДНК-целлюлозе использовали на первом этапе очистки белка-продукта гена 32 фага T4. Зараженные фагом клетки E. coli вскрывали ультразвуком, бактериальную ДНК

переваривали ДНКазой I. Супернатант после центрифугирования лизата при 30 000 об/мин в течение 2 ч надежно диализовали против буфера, содержавшего 5 мМ ЭДТА, с тем чтобы полностью удалить двухвалентные катионы во избежание атаки ДНКазы I на ДНК-целлюлозу. Диализат вносили на колонку целлюлозы с иммобилизованной на ней путем сушки одонитевой тимусной ДНК. Белок-продукт гена 32 связывался столь прочно, что 0,6 М NaCl можно было использовать для промывки и удаления других сорбированных на колонке белков, а элюцию приходилось вести 2 М NaCl [Bittner et al., 1979].

Пример 17. Очистка белка на аффинном сорбенте, несущем заранее выбранный участок ДНК [Weideli, Gehring, 1980]. Авторы предложили изящную методику получения аффинного сорбента, несущего вполне определенный фрагмент нативной ДНК. На таком сорбенте с высокой степенью избирательности можно очищать определенный, «узнающий» именно этот фрагмент белок. Последовательность этапов приготовления сорбента показана на рис. 143.

Выбранный фрагмент ДНК (в данном случае из генома дрозофилы) встраивали в плазмиду, которую отбирали, размножали и очищали методами генной инженерии (1). Затем ее линейаризировали обработкой рестриктазой, не затрагивающей встроенный фрагмент (2). После этого с помощью ограниченного гидролиза экзонуклеазой III (30 мин при 0°) удаляли с 3'-концов каждой из нитей около 300 оснований (3). Обработанную таким образом ДНК сажали на активированную по методу Нойеса и Старка (см. выше) *m*-аминобензилалоксиметилцеллюлозу. Ковалентное присоединение происходило по одонитевым концам молекулы (через C₈ гуаниловых остатков). Так получали сорбент с экспонированными, заранее выбранными фрагментами двунитевой ДНК (4).

Белковые экстракты из яиц или ядер куколок дрозофилы во избежание неспецифической сорбции смешивали с фрагментированной нативной ДНК тимуса и пропускали через колонку, заполненную описанным аффинным сорбентом в буфере следующего состава: 0,025 М NaCl + 0,01 М Трис-HCl (pH 7,4) + 5 мМ β-меркаптоэтанол + 5 мМ Mg-ацетата + 10% глицерина. Колонку промывали тем же буфером, а затем элюировали в три этапа, подавая последовательно по 20 объемов колонки 2 М NaCl, 2 М NaCl с 6 М мочевиной и 0,5%-ного раствора ДДС-Na в том же буфере. Наличие нужного белка в элюате устанавливали путем гибридизации на фильтре с радиоактивно меченной ДНК плазмид. Он обнаруживался только во фракции, элюированной ДДС-Na.

Для полного извлечения нужного белка экстракт, прошедший через колонку в исходном буфере, после окончания элюции и нового уравнивания колонки буфером пропускали через нее повторно и элюировали по той же схеме; так повторяли 8 раз. В итоге нужный белок («DB-1») из 1 кг яиц дрозофилы получали очищенным в 200 000 раз.

Пример 18. Выделение «ядра» РНК-полимеразы из полного фермента [Lowe et al., 1979]. В данном случае использовали денату-

рированную тимусную ДНК, заплавленную в агарозу (процедура приготовления сорбента описана выше). Пропущенным через сетку гелем заполняли колонку ($1,8 \times 10$ см), промывали ее 1 М раствором NaCl в буфере (0,01 М Трис-HCl, pH 7,9, +0,1 мМ ЭДТА + +0,1 мМ ДТТ + 5% глицерина), а затем — 0,25 М NaCl в том же буфере. Предварительно очищенную РНК-полимеразу вносили в том же растворе, промывали, а затем «ядро» фермента (лишенное субъединицы σ) элюировали 50 мл 0,4 М раствора NaCl. Полный фермент при этом оставался на колонке — его сродство к ДНК благодаря наличию σ -субъединицы значительно выше, чем ядра. Фермент элюировали 1 М NaCl в том же буфере со скоростью 20 мл/ч.

Пример 19. Фракционирование белков хроматина на колонке ДНК-агарозы [Nehls, Renz, 1980]. Как и в предыдущем примере, была использована денатурированная тимусная ДНК, заплавленная в агарозу. При пропускании через такую колонку хроматина, солюбилизованного обработкой микрококковой нуклеазой и очищенного от растворенных белков гель-фильтрацией на сефарозе 4В, все относительно слабо связанные с ДНК белки хроматина (кроме гистонов «ядра», т. е. H2—H4) переходят за счет конкурентного перераспределения на иммобилизованную ДНК (она — в избытке). При промывке колонки 0,1 М раствором NaCl в 5 мМ Трис-HCl (pH 7,5) с 0,1 мМ ЭДТА вместе со всей ДНК выходят и гистоны H2—H4, а остальные белки хроматина остаются на колонке. Их можно элюировать все вместе 2 М раствором NaCl (в том же буфере) или фракционировать ступенчатой элюцией (0,2—0,4—0,7—2 М NaCl). Гистон H1 выходит в 0,7 М NaCl.

Пример 20. Препаративная очистка ДНК-полимеразы I и РНК-полимеразы из *E. coli* на ДНК-сефарозе [Arndt-Jovin et al., 1975]. Использовали ДНК, ковалентно присоединенную к BrCN-активированной в лабораторных условиях сефарозе. ДНК-полимеразу очищали на колонке ДНК-сефарозы объемом 500 мл, уравновешенной 0,1 М KCl в 0,01 М фосфатном буфере (pH 6,9). Около 3,9 г белка после предварительных стадий очистки загружали на эту колонку, промывали буфером до фонового значения УФ-поглощения, а затем элюировали линейным градиентом (10 л), 0,1—1 М KCl в том же буфере с добавкой 1 мМ β -меркаптоэтанола и 0,1 мМ ЭДТА. ДНК-полимеразная активность выходила двояким пиком вблизи середины солевого градиента.

Для посадки и элюции РНК-полимеразы авторы использовали иной буфер: 0,05 М Трис-HCl (pH 7,9) + 0,1 мМ ЭДТА + 0,1 мМ ДТТ + 5% глицерина. На колонку объемом 130 мл сажали 200 мг фермента 30%-ной чистоты в 100 мл указанного буфера, промывали 0,1 М раствором NaCl в этом же буфере, а затем вели элюцию линейным градиентом (1,2 л) 0,1—1 М NaCl. При промывке выходили посторонние белки. РНК-полимераза, как и в работе Лове и соавторов, фракционировалась: начала выходило «ядро» фермента ($\beta\beta'\alpha_2$), а затем полный фермент, содержащий в своем составе и субъединицу σ (рис. 144).

Рис. 143. Последовательность операций приготовления аффинного сорбента с определенным фрагментом ДНК в качестве лиганда (см. текст) [Weideli, Gehring, 1980]



Рис. 144. Очистка РНК-полимеразы *E. coli* на ДНК-сефадексе [Arndt-Jovin et al., 1975]

1 — ядро фермента ($\beta\beta'\alpha_2$);
2 — полный фермент

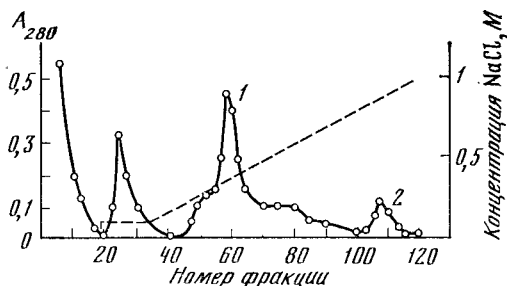
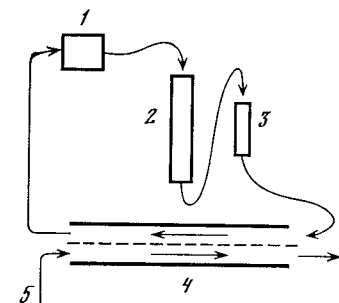
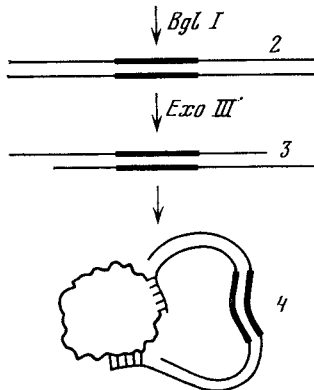
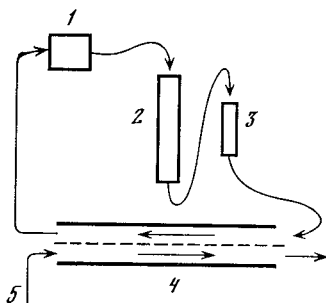


Рис. 145. Очистка ДНК-связывающих белков из ядрышек гепатомы на двух колонках ДНК-сефадекса в системе рециркуляции белкового раствора (см. текст) [Bearden, 1980]

1 — насос; 2 — большая колонка; 3 — малая колонка; 4 — диализный блок; 5 — поступление 0,15 М NaCl



Пример 21. Очистка ДНК-связывающих белков из ядрышек гепатомы Новикова распределением между двумя колонками ДНК-сефадекса [Bearden, 1980]. Предложенная автором методика УФ-пришивки ДНК к сефадексу G-10 рассмотрена выше. Для очистки ядрышковых белков была использована оригинальная система, показанная на рис. 145. В замкнутую цепь рециркуляции были включены последовательно две колонки ДНК-сефадекса: большая ($0,9 \times 25$ см), на которой иммобилизовали 44 мг гетерологичной ДНК спермы лосося, и малая ($0,9 \times 2$ см), содержавшая 0,3 мг гомологичной ДНК из ядрышек гепатомы.

Насос прогонял белковый раствор через колонки и далее через диализный блок (две пластины плексигласа с каналами, разделенные диализной пленкой). Первоначально ядрышковые белки вносили в систему в 2 М растворе гуанидинхлорида в буфере (20 мМ MOPS, pH 7,4, + 10 мМ ЭДТА + 0,1 мМ ФМСФ) и такой же раствор подавали в каналы нижней пластины диализного блока. 1—2 мг белка, растворенные в 100 мл буфера, циркулировали в этой систе-

ме со скоростью 2 мл/мин в течение часа. В присутствии 2 М гуанидинхлорида белки не связывались с ДНК. Затем через каналы пижней пластины диализного блока прокачивали 0,15 М раствор NaCl в буфере. В этих условиях циркуляцию белкового раствора продолжали еще 18—20 ч. Концентрация гуанидинхлорида в нем постепенно снижалась, и происходило связывание белков с ДНК. Благодаря постепенному снижению концентрации соли на малой колонке шло преимущественное связывание гомологичных ДНК-специфических белков ядрышка, а неспецифически сорбирующиеся белки с одинаковым успехом, т. е. пропорционально количеству ДНК, постепенно задерживались в большой и малой колонках. Затем колонки разъединяли, промывали порознь 0,15 М NaCl в буфере от несвязанных белков и элюировали двумя ступенями (0,6 М NaCl и 2 М раствор гуанидинхлорида в том же буфере).

Около 50% исходного белка вообще не связывалось с ДНК, почти весь остальной белок оказался сорбированным на большой колонке, и только 0,5 и 0,8% белка снималось двумя соответствующими ступенями элюции с малой колонки. Обе белковые фракции обладали способностью связывать на фильтре меченую ядрышковую ДНК (первая — втрое большее ее количество в расчете на 1 мг белка, чем вторая).

Пример 22. Исследование белково-нуклеиновых взаимодействий в рибосоме с помощью иммобилизованных РНК-белковых комплексов [Matspalu et al., 1982; Sarapu, Villems, 1982]. В серии изящных работ, выполненных в Тартуском университете, аффинные сорбенты получали путем закрепления на эпокси-активированной сефарозе 4В (через окисленный периодатом 3'-конец) молекул тРНК, синтетических гомополинуклеотидов и РНК фага MS2. Через такие сорбенты пропускали растворы суммарных белков 50S субъединицы или целой рибосомы *E. coli*. На сорбентах формировались белково-нуклеиновые комплексы, в которых участвовали только строго определенные белки рибосомы (как показала идентификация элюцией и двумерным электрофорезом). Замечательно, что эти комплексы обладали способностью специфически связывать компоненты, участвующие в биосинтезе белка в рибосоме на соответствующих его этапах.

Например, каждый комплекс одной молекулы тРНК и восьми белков большой субъединицы рибосомы (L2, L15—L18, L22, L33, L34) связывал еще одну молекулу тРНК и молекулу 5S РНК, а также целую 30S субъединицу рибосомы. Комплекс молекулы гомополинуклеотида, шести молекул белка из малой субъединицы и двух из большой субъединицы рибосомы (S1, S3—S5, S9, S13, L2, L17) связывал молекулу тРНК, причем избирательно: комплекс с участием поли(U) связывал тРНК^{Phe}, а комплекс с участием поли(A)—тРНК^{Lys}. В отсутствие преформированного комплекса с рибосомальными белками эти тРНК с иммобилизованными гомополинуклеотидами не связывались.

В аналогичной работе Чэн и соавторы также использовали колонки с комплексными белково-нуклеиновыми лигандами. На се-

фарозе с активированными гидразидом спейсерами по окисленным периодатом натрия 3'-концам они фиксировали 5S или 5,8S РНК из печени крысы. Затем через каждую из колонок пропускали раствор всех рибосомальных белков. Благодаря биоспецифическим взаимодействиям на 5S РНК сорбировались белки L6, L7 и L19, а на 5,8 S РНК — L6, L8, L19, S9 и S13. Эти РНК-колонки служили аффинными сорбентами как для тРНК, так и для тройных комплексов инициации (eIF2—GTP—Met-тРНК^{Met}) и элонгации (EF-1 α —GTP—Phe-тРНК^{Phe}). Интересно, что бинарные комплексы, содержащие фактор инициации или элонгации и GTP, на этих сорбентах не задерживались [Chan et al., 1982].

В заключение упомянем два варианта очистки обратной транскриптазы на ковалентно связанных с матрицей олиго(dT)-целлюлозе [Weissbach, Poonian, 1974] и на поли(C)-агарозе [Lin, Papini, 1979; Van Muijen, Warnaar, 1980]. Во всех трех случаях элюцию вели примерно одинаковыми линейными градиентами концентрации KCl (0,1—0,5 M).

Кроме того, заслуживает внимания опыт дополнительной аффинной очистки продажных препаратов ДНКазы от малых примесей РНКаз и протеаз. Раствор ДНКазы пропускали сначала через колонку с иммобилизованным на BrCN-активированной сефарозе ингибитором протеаз из лимской фасоли. Этот сорбент надежно связывал трипсин и химотрипсин. Затем раствор очищали от РНКаз на колонке с «Agarose-5'-(4-aminophenyl-phosphoryl-uridine-2'(3')-phosphate)», продажным сорбентом фирмы «Miles» [Wang, Moore, 1973; Ross et al., 1982].

БИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭЛЮЦИЯ БЕЛКОВ

В этом разделе мы рассмотрим несколько примеров такого использования аффинных сорбентов с групповой специфичностью, когда элюцию вели раствором субстрата, осуществляя конкурентную десорбцию вещества.

Пример 1. Очистка регуляторной субъединицы сАМР-зависимой протеинкиназы [Weber et al., 1979a]. В качестве лиганда использовали модифицированное по C₈ производное сАМР — 8-(2'-оксиэтил)-тио-сАМР, которое по концевому гидроксилу оксиэтила ковалентно связывали с эпокси-активированной сефарозой 6В. В отличие от посадки на BrCN-активированную сефарозу здесь лиганд присоединяется к сефарозе прочной эфирной связью через длинный гидрофильный спейсер, что обеспечивает высокую степень сродства к сАМР-связывающим белкам. В частности, регуляторная субъединица протеинкиназы даже из раствора с концентрацией 25 мкг/мл связывается практически полностью. Кроме того, матрица устойчива к действию фосфодиэстеразы, которая может присутствовать в неочищенном тканевом экстракте. 500 мл концентрированного экстракта из сердца быка (120 мг белка в 1 мл) авторы медленно пропускали через колонку с упомянутым сорбентом.

Регуляторная субъединица прочно сорбировалась, а посторонние белки можно было отмыть 2 М NaCl. Колонку промывали 1 мМ раствором 5'-AMP, а затем — 1 мМ cAMP (эта концентрация еще не элюирует белок). Элюцию вели медленным пропусканием через колонку 6 мл 30 мМ раствора cAMP при pH 6,5 и комнатной температуре. Регуляторная субъединица была очищена в 1250 раз.

Пример 2. Очистка глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и малик-фермента на 2',5'-ADP-сефарозе 4В [Lee et al., 1978]. «2',5'-ADP-Sepharose 4В» — сорбент с очень широкой групповой специфичностью, связывающий все ферменты, для которых коферментом служит НАДФ. Авторы умело использовали то обстоятельство, что два очищаемых фермента обладают значительно большим сродством к данному сорбенту, чем все остальные ферменты той же группы. На колонку загружали большой избыток неочищенного гомогената (после центрифугирования при 27 000 g в течение 20 мин) почек мыши или целых дрозофил. Происходило вытеснение из связи с лигандом всех прочих ферментов двумя названными. Колонку промывали буфером, а затем оба фермента элюировали одновременно 0,2 мМ раствором НАДФ в фосфатном буфере. Затем их разделяли хроматографией за ДЭАЭ-сефадексе.

Заметим, что в предшествующей работе с участием того же автора [Lee, Johansson, 1977] было показано, что в точном соответствии с характером присоединения фосфатов к аденозину сефарозные сорбенты, несущие на конце шестичленного гидрофобного спейсера АТР, хорошо связывают дегидрогеназы и киназы, зависящие от НАД, а сорбенты, несущие 2',5'-ADP, — дегидрогеназы и другие ферменты, зависящие от НАДФ. Наконец, сорбенты с 3',5'-ADP лучше других сорбируют ферменты, зависящие от КоА.

Как было указано выше, более эффективную очистку глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (из эритроцитов человека) можно осуществить на аффинном сорбенте, у которого лигандом служит НАДФ⁺ [Craney, Goffredo, 1983].

Примеры 3—7. Биоспецифическая элюция с красителя «Cibacron Blue F3GA». Уже отмечалось, что этот краситель обладает широким спектром аффинного сродства ко многим ферментам, использующим в качестве субстрата или кофактора АТР. Вот почему в последних работах АТР часто фигурирует в качестве биоспецифического элюента. Так, аффинная хроматография на «Cibacron Blue-Sepharose 4В» [Lascau et al., 1981] была использована на начальном этапе препаративной очистки нуклеозиддифосфаткиназы из сердца свиньи. Экстракт из 1 кг сердец в объеме смешивали со 100 мл сорбента, промывали буфером (pH 8) на фильтре и вносили в колонку размером 2,4 × 26 см. Слабо сорбированные белки вымывали буфером с добавлением 0,3 М NaCl, а фермент элюировали тем же раствором, но содержавшим еще 1,5 мМ АТР.

Дамус [Dahmus, 1981] использовал «Affi-Gel Blue» на заключительном этапе многоступенчатой очистки казеинкиназы I из тимуса. Предварительно очищенный препарат сажали на небольшую колонку (0,9 × 8 см), уравновешенную буфером, содержавшим 0,3 М

NH_4Cl , промывали 0,6 М NH_4Cl в том же буфере, а элюцию фермента вели сочетанием линейного градиента концентрации соли (0,6—3 М NH_4Cl) и 10 мМ АТР. Относительно высокая концентрация АТР и необходимость дополнить ее градиентом, лежащим в области высоких концентраций соли, говорит об очень прочной сорбции фермента на красителе.

Несколько неожиданная ситуация сложилась при очистке аспарагинсинтетазы из печени крысы [Hongo, Sato, 1981]. Фермент катализирует синтез аспарагина из аспарагиновой кислоты и донора аммиака с участием АТР. После предварительной очистки осаждением сульфатом аммония и ионообменной хроматографией ферментную фракцию сорбировали на колонке голубой агарозы, уравновешенной буфером следующего состава: 0,02 М Трис- HCl (pH 7,8) + 3 мМ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ + 1 мМ β -меркаптоэтанола (Mg^{2+} необходимы для сорбции фермента). Посторонние белки с колонки вымывали буфером с добавлением 1 мМ аспарагиновой кислоты и 1 мМ АТР; фермент при этом оставался на колонке (рис. 146). Его элюцию острым пиком осуществляли тем же буфером с добавлением 1 мМ аспарагиновой кислоты и 0,4 мМ АТР. Аспарагиновая кислота без АТР, как и АТР без аспарагиновой кислоты, фермента с колонки не снимали. Интересно отметить, что в присутствии 1 мМ АТР фермент не элюировался, а в 10 раз меньшая концентрация кофактора обеспечивала (в сочетании с аспарагиновой кислотой) весьма успешную элюцию. По-видимому, избыток АТР ингибирует образование фермент-субстратного комплекса в растворе.

Любопытные различия в сорбции двух ферментов на красителе были обнаружены [Lindell et al., 1979] при очистке на «Blue-dextran Sepharose» ДНК-полимеразы I из *E. coli* и ДНК-полимеразы фага Т4. Первый фермент легко элюируется малыми концентрациями (0,2—0,75 мМ) дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и значительно труднее — солью (0,15 М NaCl). Во втором случае, наоборот, фермент сравнительно легко снимается с колонки 0,15 М раствором KCl и с трудом — трифосфатами в концентрации около 10 мМ. По-видимому, ДНК-полимераза I связывается с красителем по участку присоединения трифосфатов, что обуславливает возможность конкурентной элюции, а ДНК-полимераза фага Т4 связывается где-то в ином месте. Биологические различия двух ДНК-полимераз хорошо известны: например, вторая из них (в отличие от первой) имеет цистеин в активном центре и не обладает экзонуклеазной активностью.

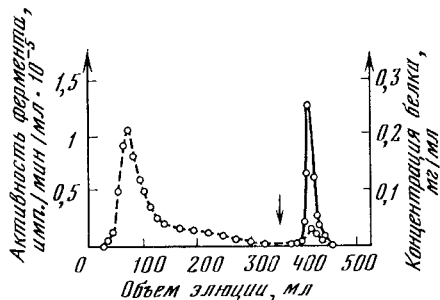


Рис. 146. Очистка аспарагинсинтетазы из печени крысы на колонке голубой агарозы [Hongo, Sato, 1981]

Сплошная линия — активность фермента, пунктир — содержание белка; смена элюента (см. текст) указана стрелкой

В качестве еще одного недавнего примера биоспецифической элюции с того же аффинного сорбента упомянем заключительный этап очистки валил-тРНК-синтетазы из *Euglena gracilis*. Элюцию осуществляли с помощью 1 мМ раствора тРНК^{Val} из дрожжей [Sarantoglou et al., 1980].

Пример 8. Очистка белка гес А из *E. coli* на ДНК-целлюлозе [Cox et al., 1981]. Белок гес А связывается с ДНК, но обладает и высоким сродством к АТР. Из лизата *E. coli* КМ 1842 (сверхпродукента гес А) его осаждали полиэтиленимином, фракционировали сульфатом аммония, удаляли полиэтиленимин (он конкурирует с ДНК) на фосфоцеллюлозе, а затем вносили на колонку ДНК-целлюлозы. После промывки буфером с 0,05 М NaCl гес А элюировали 1 мМ раствором АТР.

Пример 9. Очистка кислой β -галактозидазы из печени кошки [Holmes, O'Brien, 1979]. В процессе очистки конкурентная аффинная хроматография использовалась трижды. Вначале осветленный гомогенат из 1,2 кг печени сажали на колонку «Сон А-Seph-
harose», промывали 0,5 М NaCl в 0,01 М Na-фосфатном буфере (рН 7) и элюировали α -метилманнозидом. Затем вводили этап ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Для второй аффинной хроматографии использовали сорбент с иммобилизованным на сефарозе аналогом субстрата — тиогалактопиранозидом, а элюцию вели 50 мМ раствором D-галактозы. Наконец, для концентрирования фермента использовали снова первый вариант аффинной хроматографии на маленькой колонке «Сон А-Seph-
harose» с элюцией α -метилманнозидом.

Пример 10. Очистка метилазы белка из мозга теленка на SAN-сефарозе [Kim et al., 1978]. Метилазы, катализирующие метилирование белков, как и лучше изученные метилазы тРНК, в качестве донора метила используют S-аденозилметионин (SAM), который после переноса метильной группы на белок превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH). Последний, являясь ингибитором метилазной активности, обладает высоким сродством к ферменту.

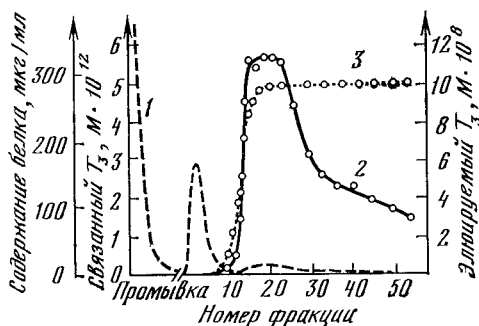
Аффинную очистку метилаз вели на сорбенте, полученном иммобилизацией SAH на сефарозе. Исходной матрицей служила «АН-Seph-
harose 4В». Спейсер активировали присоединением остатка бромуксусной кислоты в реакции с O-бром-ацетил-N-оксисукцинимидом. SAH фиксировали инкубацией с суспензией активированного сорбента в течение 3 сут при комнатной температуре. Частично очищенный фермент сорбировали на SAN-сефарозе в 0,005 М Na-фосфатном буфере (рН 6,2) с 5 мМ ЭДТА и 2,4 мМ β -меркаптоэтанолом. Биоспецифическую элюцию вели раствором субстрата — 0,02 мМ SAM в том же буфере.

Примеры 11, 12. Очистка рецепторов гормонов. Рецепторы гормонов зачастую содержатся в тканях-мишенях в ничтожно малых концентрациях, но, как уже указывалось, обладают очень высоким сродством к гормонам, поэтому аффинная хроматография — единственный эффективный способ их очистки. Рецепторы тиреоидных гормонов экстрагируют из ядер концентрированными солевыми растворами. Очистку рецептора для 3,5,3'-трийодтиронина (Т₃) из такого экстракта вели на колонке сефарозы с иммобилизованным

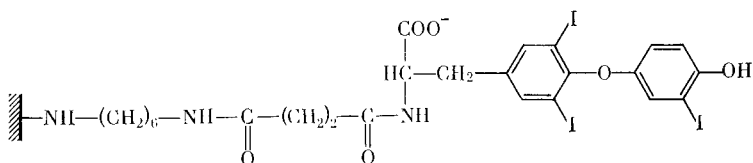
на ней гормоном [Latham et al., 1981]. Показано, что аминокгруппа T_3 не участвует в связывании с рецептором, поэтому по ней гормон присоединяли к матрице. Сначала с помощью дициклогексилкарбодимида получали диэфир глутаровой кислоты с двумя молекулами N-оксисукцинимиды. Этот активированный диэфир реагировал в диметилформамиде при 0° с двумя молекулами T_3 , образуя аминокзамещенный димер аналога гормона. Наконец, последний в 0,1 М

Рис. 147. Очистка рецептора для 3,5,3'-триодтиронина (T_3) на колонке сефарозы с иммобилизованным гормоном (см. текст) [Latham et al., 1981]

- 1 — содержание белка;
2 — концентрация связанного T_3 ;
3 — концентрация элюируемого T_3



растворе $NaHCO_3$ в 50%-ном диоксане взаимодействовал с «АН-Sephарозе 4В», в результате чего получился аффинный сорбент следующей структуры:



Экстрагированные из ядер рецепторы тироидных гормонов сажали на сорбент, промывали 0,2 М раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в буфере и элюировали 0,1 мкМ раствором меченого гормона. Рецептор выходил в комплексе с $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$, поэтому его можно было обнаружить по задержанию радиоактивного комплекса на ДЭАЭ-целлюлозных фильтрах DE-81.

В этой работе интересно отметить подбор оптимального соотношения количества аффинного сорбента и белкового раствора. Недостаток сорбента, естественно, ведет к неполной экстракции рецептора, а избыток затрудняет конкурентную элюцию свободным гормоном и требует использования повышенной концентрации дорогостоящего препарата. Подбор вели «титрованием»: к определенному количеству экстракта добавляли порциями сорбент, комплекс его с рецептором удаляли центрифугированием и следили за убылью рецептора в супернатанте по связыванию им радиоактивного гормона (детектирование на тех же фильтрах). В результате такого подбора элюцию удавалось осуществлять меченым гормоном в указанной выше, очень малой концентрации. График элюции показан на рис. 147.

Смит и соавторы с помощью аффинной хроматографии очищали рецептор прогестерона человека. Содержание рецептора в матке составляет лишь 0,002 % суммарного белка, и он весьма лабилен. В качестве лиганда использовали 11-дезоксикортикостерон. Гормон сажали на BrCN-активированную сефарозу 4В в виде конъюгата с бычьим сывороточным альбумином. Полученный таким образом аффинный сорбент инкубировали 18 ч с частично очищенным цитозолем матки, промывали 0,4 М KCl и элюировали 3 мкМ раствором меченного тритием прогестерона. Рецептор выходил в комплексе с гормоном. Операция обеспечивала очистку в 10 000 раз. Вместе с предварительной 6-кратной очисткой цитозоля осаждением сульфатом аммония это позволило авторам получить гомогенный препарат рецептора [Smith et al., 1981].

Пример 13. Очистка РНК-полимеразы II на α -аманитин-сефарозе [Lutter, 1982]. Этот пример нельзя назвать типичным; тем не менее он заслуживает упоминания неожиданностью способа элюции вещества с аффинного сорбента. Такой способ может оказаться плодотворным и в других случаях. Как известно, α -аманитин является мощным ингибитором РНК-полимеразы II (из любого источника) и очень прочно с ней связывается ($K_L \approx 10^{-9}$ М). Спектры УФ-поглощения РНК-полимеразы II и α -аманитина сильно отличаются друг от друга. Фермент, как обычно для белков, имеет максимум поглощения при 280 нм, в то время как максимум поглощения ингибитора лежит при 310 нм. Было показано, что ингибированная до 20 % исходной активности РНК-полимераза II (в растворе) полностью реактивируется при освещении в течение двух часов УФ-светом с длиной волны 314 нм. Очевидно, что поглощение световой энергии ингибитором приводит к разрушению его комплекса с ферментом, причем так, что активность последнего не страдает. Автору удалось использовать этот прием для элюции с аффинного сорбента. Закрепленный на сефарозе α -аманитин сорбировал РНК-полимеразу II, которую после промывки сорбента удавалось элюировать освещением при 314 нм.

В рассмотренных примерах очистка белка с помощью аффинного сорбента проходила путем сорбции белка и последующей его элюции. Несмотря на мягкость аффинного взаимодействия, возможны ситуации, когда такая процедура инактивирует белок. В этих случаях сорбцию на аффинном сорбенте можно попытаться использовать для решения обратной задачи, ведущей к тому же результату, — для задержания на нем примесей. Разумеется, ввиду многочисленности и разнообразия примесных белков для этой цели нельзя использовать сорбенты с индивидуальной или даже групповой специфичностью. Однако решение может быть найдено на путях использования иммуносорбентов с полиспецифической антисывороткой против всей совокупности примесных белков.

Такой вариант аффинной очистки был недавно использован [Weare et al., 1982]. Очищали фермент конверсии, катализирующий в почках отщепление дипептида от ангиотензина I. Процесс очистки включал два этапа иммуноадсорбции. Сначала получали ан-

тисыворотку против хорошо очищенного фермента конверсии (из легкого — его легче очистить) и иммобилизовывали ее на BrCN-активированной сефарозе. Предварительную очистку фермента из почки проводили методом ионообменной хроматографии, а затем часть отобранного по активности материала пропускали через упомянутый иммуносорбент. На нем задерживался только сам фермент, а вся совокупность примесных белков выходила. Затем ими иммунизировали кролика, получали антисыворотку, фиксировали ее на сефарозе и тем самым образовывали второй иммуносорбент, специфичный ко всей совокупности примесных белков; авторы называли его «обратным иммуносорбентом» («reverse immunoabsorbent»). На нем-то и сорбировали примесные белки оставшейся части активного материала (после дополнительной очистки его на оксиапатите). Таким образом, получали не связавшийся с сорбентом, очищенный в 3400 раз почечный фермент конверсии с выходом 26%.

Заканчивая рассмотрение аффинной хроматографии белков, необходимо отметить, что вне поля нашего зрения осталась родственная область приготовления и использования иммобилизованных ферментов. Многое из того, что было сказано о способах посадки лигандов на активированные матрицы, имеет к этой области прямое отношение. Однако к кругу физико-химических методов исследования белков и нуклеиновых кислот использование иммобилизованных ферментов имеет лишь косвенное отношение, так что за недостатком места мы на нем остановиться не сможем.

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Фенилборная кислота в качестве лиганда

Пример 1. Отделение аминоксил-тРНК от тРНК [Mc Cutchan et al., 1975]. Смесь тРНК, из которых только одна была предварительно аминокислирована, растворяли в буфере (0,05 М метилморфолина, pH 7,2—7,7 + 0,2 М NaCl + 40 мМ MgCl₂ + 20% этанола) и пропускали через колонку, заполненную продажным сорбентом «Acetylated DBAE-cellulose» фирмы «Collaborative Research». Слегка щелочной pH буфера достаточен для задержания на колонке всех неацилированных тРНК и вместе с тем еще не создает реальной опасности снятия аминокислоты с аминоксил-тРНК, которая свободно проходит через колонку. 0,2 М NaCl препятствует неспецифической ионной сорбции, а 20% этанола — гидрофобной сорбции аминоксил-тРНК. Неацилированные тРНК можно затем снять с колонки промывкой кислым буфером (0,2 М NaCl + 0,05 М CH₃COONa, pH 5).

Как уже упоминалось, задержание неацилированных тРНК при нейтральных и даже слабых значениях pH более успешно можно осуществить на колонке, заполненной нитробензилборил-замещенным полиакриламидом [Johnson, 1981].

Здесь уместно упомянуть обратный по отношению к только что

рассмотренному характеру распределения тРНК и аминоксил-тРНК вариант препаративной очистки тРНК определенной специфичности, хотя он и не связан с использованием борной кислоты в качестве лиганда. Периодатное окисление матрицы (сефадекса) приводило к образованию свободных альдегидных групп. Нужную тРНК аминокислировали и в присутствии восстановителя (цианоборгидрида натрия) ковалентно присоединяли к сорбенту по аминоксигруппе аминокислоты через образование шиффовых оснований. Неаминокислированные тРНК вымывали с сорбента, а очищаемую тРНК затем снимали с него путем ее деакилирования в щелочной среде. Аминокислота при этом оставалась на сорбенте, который для повторного использования был уже не пригоден [Wang, Wong, 1983].

Пример 2. Очистка РНК от примеси ДНК [Ackerman et al., 1979]. После синтеза РНК *in vitro* РНК-полимеразой III матричную ДНК удаляли обработкой ДНКазой I, фенольной экстракцией и гель-фильтрацией на сефадексе G-50. Был получен препарат, в котором наряду с новосинтезированной РНК (2—10 мкг/мл) оставалось еще 10—100 мкг/мл ДНК. Полной очистки РНК от ДНК удалось добиться на колонке «Acetylated DBAE-cellulose». Сухой продажный сорбент замачивали в 1 М растворе NaCl в 0,05 М Na-ацетатном буфере (рН 5,1) в течение 2 ч и вносили в микроколону, в качестве которой использовали пипетку на 5 мл (1,5 мл набухшего сорбента). Пипетку охлаждали во льду, так как было замечено, что при температуре выше 2° РНК сорбируется не полностью. Сорбент промывали таким же посадочным буфером (рН 7,7), как в примере 1. Затем в том же буфере со скоростью 1 мл/мин через колонку пропускали раствор дрожжевой тРНК (1 мг/мл). После этого проводили элюцию кислым буфером (0,2 М NaCl + 0,05 М Na-ацетат, рН 5,1, + 1 мМ ЭДТА). Такая обработка была введена для того, чтобы блокировать места необратимой сорбции РНК. Колонку снова уравнивали посадочным буфером и в таком виде хранили при 4° для дальнейшего многократного использования. Смесь РНК и ДНК лиофилизировали, растворяли в 1 мл того же посадочного буфера, прогревали 2 мин при 100°, быстро охлаждали во льду (для разрушения возможных РНК—ДНК-гибридов), осветляли центрифугированием и медленно, в течение 40 мин, вносили на колонку. Тем же буфером вымывали ДНК до полной прозрачности элюата, а затем очищенную таким образом РНК элюировали упомянутым выше кислым солевым раствором.

Ковалентная хроматография ртутных производных НК

Применение тиоловых сорбентов для ковалентной хроматографии нуклеиновых кислот базируется на возможности получения их ртутных производных. Такие производные можно получать двумя способами. Во-первых, в ходе матричного синтеза РНК можно использовать меркурированные по С₅ пиримидинового кольца

Hg-СТР и Hg-УТР — эти производные включаются в цепочку синтезируемого полинуклеотида. Во-вторых, по тем же положениям можно вести меркурирование уже готовых молекул ДНК (только по цитозину) и РНК. Меркурирование 0,02 М раствора пиримидин-нуклеотидов ведут путем инкубации в 0,05 М растворе уксуснокислой ртути в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 6) при 50° в течение 3 ч с последующей хроматографической очисткой на ДЭАЭ-целлюлозе [Dale et al., 1975]. В цитированной ранее работе [Feist, Danna, 1981] предложена несколько иная пропись меркурирования СТР: используются на порядок более концентрированные растворы реагентов при молярном соотношении Hg/СТР, равном 5. Полнота меркурирования, по данным этих авторов, — более 98%. Описан аналогичный метод меркурирования РНК [Dale, Ward, 1975], в результате которого оказались модифицированными 10—15% оснований РНК. Сходным образом меркурировали и плазмидную ДНК [Longacre, Mach, 1978].

Ртутные производные НК прочно фиксируются на тиоловых сорбентах многочисленными связями S—Hg.

П р и м е р 3. Исследование процесса транскрипции в ядрах печени крысы [Beebe, Carty, 1980]. Ядра инкубировали в присутствии четырех нуклеозидтрифосфатов, включая Hg-СТР, затем вскрывали обработкой ДНКазой I, протеазой и 0,6%-ным раствором ДДС-Na. РНК экстрагировали фенолом и хлороформом, очищали гель-фильтрацией и осаждали этанолом. Было проверено, что кинетика и результаты транскрипции не изменяются при замене СТР на Hg-СТР.

Суммарную ядерную РНК растворяли в 0,5—1 мл 0,01 М Na-ацетатного буфера (рН 6), содержащего 0,5% ДДС-Na, и прогревали 5 мин при 100° для разрушения агрегатов и диссоциации возможных двинитевых структур РНК и остаточных РНК—ДНК-гибридов. Затем раствор вносили на термостатированную при 50° колонку тиопропил-сефарозы 6В размером 5 × 1 см, уравновешенную тем же раствором, и выдерживали при этой температуре 30 мин. Повышенная температура (но не выше 50°!) увеличивает эффективность связывания на сорбенте новосинтезированной меркурированной РНК. Затем температуру снижали до 20° и промывали колонку последовательно избытком того же буфера, водой, 50%-ным водным раствором диметилсульфоксида (ДМСО) и снова водой. Отмечено, что промывка ДМСО существенно улучшала избирательность связывания Hg-РНК. Элюцию последней вели 50 мМ раствором β-меркаптоэтанола в 0,01 М Na-ацетатном буфере (рН 6). Для отбора фракций, содержащих РНК, ее в ходе синтеза одновременно с меркурированием метили тритием с помощью ³H-УТР.

Аналогичная работа была опубликована несколько ранее [Reff, Davidson, 1979], но в ней связывание Hg-РНК с тиоловым сорбентом вели при комнатной температуре и не использовали промывку ДМСО. Ферраро и соавторы с помощью тиолового сорбента отделяли фрагменты хроматина из печени свиньи, связанные с новосинтезированной меркурированной РНК [Ferraro et al., 1982].

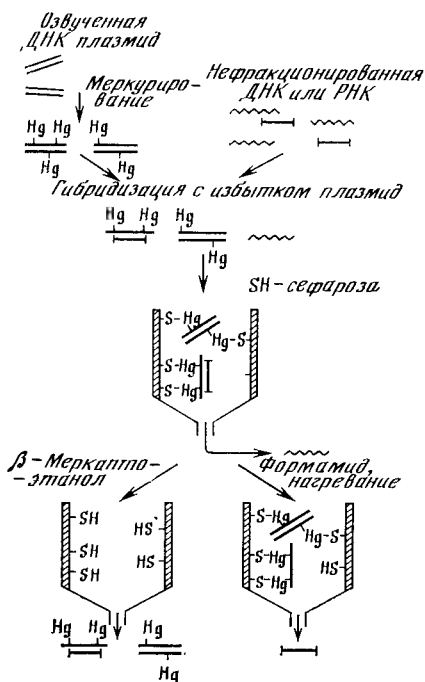


Рис. 148. Последовательность операций отбора и очистки комплементарных к определенному гену участков ДНК или РНК гибридизацией с меркурированными фрагментами плазмид со встроенным геном, по которому ведется отбор (см. текст) [Longacre, Mach, 1978]

ментарные к плазмидной ДНК. Затем следует элюция 97 %-ным формамидом при повышенной температуре. Двунитевые структуры диссоциируют, и очищенные комплементарные участки ДНК или РНК, не будучи связанными с матрицей, выходят из колонки. Остаточную в колонке меркурированную плазмидную ДНК можно снять, как обычно, элюцией β-меркапто-этанолом.

Пример 4. Отбор и очистка комплементарных участков ДНК или РНК гибридизацией меркурированной ДНК [Longacre, Mach, 1978]. Принцип метода иллюстрирует рис. 148. Фрагмент ДНК, по которому ведется отбор, например содержащий определенный ген, встраивают и размножают в плазмиде. Очищенные плазмиды дробят ультразвуком или линейаризируют действием рестриктаз, а затем меркурируют, как описано выше. Фрагментированные ДНК или РНК, из которых надлежит отобрать комплементарные участки, гибридизуют с ДНК меркурированных плазмид в условиях, когда последняя находится в избытке. Гибридные молекулы (вместе с молекулами ренатурированной плазмидной ДНК) вносят на колонку SH-сефарозы. При этом нити плазмидной ДНК через атомы ртути ковалентно связываются с сорбентом (на рис. 148 для ясности он изображен в виде заштрихованных полосок у стенок колонки, тогда как в действительности он заполняет весь ее объем). Промывка колонки удаляет из нее не вошедшие в состав гибридов, т. е. не комплементарные фрагменты нуклеиновых кислот.

Приведем некоторые технические детали эксперимента. Отбор вели из кДНК, синтезированной *in vitro* обратной транскриптазой по глобиновой мРНК, и из синтезированной, также *in vitro*, РНК. В обоих случаях вводили радиоактивную метку из ^3H -СР. Гибридизацию вели в 50 %-ном растворе формамида в буфере (0,3 М NaCl + 0,02 М Трис-HCl, pH 7,8, + 1 мМ ЭДТА) при концентрации плазмидной ДНК 4 мкг/мл и в 5–6 раз меньшей концентрации гибридуемой НК. Колонку SH-сефарозы предварительно промывали 97 %-ным раствором формамида в буфере А (0,1 М NaCl + 0,01 М Трис-HCl, pH 7,6, + 1 мМ ЭДТА) при 50°. При комнатной температуре загружали на нее инкубационную смесь после гибридизации из расчета 10 мкг плазмидной ДНК на 1 мл сорбен-

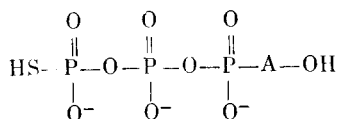
та. Присутствие до 60% формамида не мешало связыванию нитей меркурированной ДНК на колонке. Промывку от несвязавшихся ДНК или РНК вели 60%-ным раствором формамида в буфере А при комнатной температуре. В этих условиях истинные гибриды еще сохраняют двуниевую структуру, а случайные, частично комплементарные комплексы диссоциируют. Неспецифически сорбированные на матрице молекулы снимали совместным действием соли (в буфере А) и формамида. Элюцию вели 97%-ным раствором формамида в том же буфере с подогревом колонки в случае комплексов ДНК — ДНК до 40°, а в случае гибридов РНК — РНК — до 65° (в присутствии высокой концентрации формамида гибридные молекулы диссоциируют труднее, чем двуниевые ДНК).

Описанный подход можно использовать и для очистки рестриктов ДНК, содержащих определенную последовательность, из продуктов переваривания рестриктазами суммарных нативных ДНК или для оценки содержания определенных генов в исследуемой ДНК путем титрования избытком меченой кДНК. Авторы отмечают, что аналогичные задачи решались путем гибридизации с НК, сорбированными на целлюлозе. Однако гибридизация с участием иммобилизованных НК идет хуже, а при последующем плавлении гибридов с матрицы, могут частично сниматься и не закрепленные ковалентной связью молекулы, по которым идет отбор.

Тонкость предлагаемого метода связана с выбором степени меркурирования исходной ДНК. При недостаточном включении ртути ДНК будет ненадежно фиксирована на сорбенте, а при избыточном прочность гибридов ослабевает так что отбираемый материал может частично сниматься с колонки в ходе ее промывки.

Аналогичный прием был использован для исследования экспрессии уникальных генов яйцевода [Mizuno, Sox, 1979]. Здесь вели отбор меркурированной ядерной РНК. Варьируя продолжительность инкубации с большим избытком меркурированной РНК, при помощи колонки тиол-сефарозы можно отделять фрагменты ДНК, кодирующие редко или обильно представленные мРНК [Bajwa et al., 1982].

Пример 5. Отбор новосинтезированной РНК за счет присоединения серы на ее 5'-конец и связывания с ртутьсодержащим сорбентом [Smith et al., 1978]. Возможность введения серы на 5'-конец молекулы новосинтезированной РНК обусловлена тем, что без ущерба для протекания процесса транскрипции АТР (или GTP) можно заменить аналогом, у которого вместо одного из атомов кислорода при фосфате, стоящем в γ -положении, находится атом серы:



Соответствующий препарат под торговым названием «Adenosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)» (сокращенно — «АТР- γ -S») выпускается фирмой «Boehringer». В результате такого синтеза получается молекула РНК, отличающаяся от обычной только тем, что на ее 5'-конце в составе конечного трифосфата находится атом серы. Однако этого достаточно, чтобы такие молекулы можно было отобрать ковалентным

связыванием на «Affi-Gel 501». Их затем можно легко снять с сорбента элюцией 10 мМ раствором ДТТ в посадочном буфере (0,1 М NaCl + 0,04 М Трис-HCl, pH 7,9, +1 мМ ЭДТА + 0,1% ДДС-Na). Авторы отмечают, что поры агарозной матрицы продажного «Affi-Gel 501» недостаточно велики, так что молекулы РНК, более крупные, чем 5S РНК, проникают в них с трудом. Можно приготовить меркурированную агарозу и в лабораторных условиях, используя уменьшенную концентрацию BrCN для активирования матрицы, с тем чтобы снизить степень дополнительной сшивки нитей агарозы (см. выше).

Аналогичный прием был использован в работе [Silverman et al., 1979]. Эти авторы перед началом синтеза РНК ввели дополнительный этап: инкубационную смесь, содержащую АТР- γ -S и три обычных трифосфата, предварительно выдерживали в течение часа при 0°. За это время происходил обмен концевых фосфатов, и сера появлялась в γ -положении остальных трифосфатов, в результате чего она включалась на 5'-конец и таких молекул РНК, синтез которых начинался не с АТР.

Выше при рассмотрении примера, где описывалось извлечение тиофосфорилированных гистонов, была уже упомянута возможность хроматографической очистки на «Affi-Gel 501» вирусной ДНК, синтезированной *in vivo*, с помощью введения в нее серы из тиофосфата натрия. Тиофосфат проходит через наружную мембрану внутрь клетки, где ферменты включают его серу в предшественники ДНК [Sun, Allfrey, 1982b].

Лиганды белковой природы

Пример 6. Лау и соавторы предложили метод быстрой очистки суперскрученной ДНК фага PM2 на H1-агарозе. По их наблюдениям, гистон H1 имеет значительно большее сродство к суперскрученной кольцевой ДНК, чем к линейной или к расплавленной кольцевой ДНК, несущей разрывы в нитях. На BrCN-активированной агарозе типа «Bio-Gel A-0,5m» через спейсер фиксировали гистон H1 (17 мкг на 1 мл геля). Колонку с таким сорбентом уравнивали 0,2М раствором NaCl в 0,02 М Трис-HCl (pH 8,1) с 1 мМ ЭДТА. Смесь ДНК вносили на колонку в том же растворе. ДНК типов I и III не сорбировались, часть ДНК I (суперскрученной) тоже выходила при промывке колонки. Зато сорбированная ДНК I элюировалась 0,7 М раствором NaCl очищенной до более чем 90%-ного содержания ее в конечном продукте [Lau et al., 1979].

Пример 7. Вейсброд и Вайнтрауб описали способ выделения нуклеосом, участвующих в транскрипции, путем сорбции на агарозе с иммобилизованными негистоновыми белками хроматина HMG-14 и HMG-17. Основанием для разработки этого метода послужили ранее опубликованные данные авторов о том, что указанные белки преимущественно связываются именно с активными нуклеосомами, повышая их чувствительность к обработке ДНКазой I.

Очищенные белки НМ-14 и НМ-17 сажали на агарозу, активированную карбонилдимидазолом («Reacti-Gel» фирмы «Pierce»), в 0,1 М Na-боратном буфере (рН 8,5) с осторожным перемешиванием в течение 2 сут на холоду при соотношении 2 мг белка на 1 мл сорбента. Суспензию тщательно промывали пятью сменами щелочного и кислого буферов, содержавших 0,5 М NaCl. Хроматин, освобожденный от негистоновых белков, или очищенную из хроматина смесь активных и неактивных нуклеосом сажали на полученный таким образом сорбент при перемешивании суспензии в течение 16 ч внутри диализного мешочка с одновременно диализом против 5 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7). Затем сорбент переносили в колонку, промывали буфером и элюировали ступенями 0,1—0,3—0,4—0,6—2 М NaCl в том же буфере.

75% нуклеосомного материала не сорбировалось и выходило с промывкой. 0,1 М NaCl снимал чистую ДНК (5% исходного количества), а 0,4М NaCl элюировал сорбированные на белках нуклеосомы (18% исходного материала по ДНК). 40% ДНК, входящей в состав этих нуклеосом, образует прочные гибриды с избытком ядерной РНК (ДНК из несорбирующихся нуклеосом гибридизуется лишь на 5%, ДНК из исходного хроматина — на 18%). С учетом того, что транскрипция идет по одной из двух нитей ДНК, можно заключить, что 80% отобранных таким образом нуклеосом активно участвуют в процессе транскрипции [Weisbrod, Weintraub, 1981]. В этой же работе описано использование для тех же целей в качестве матрицы активированного карбонилдимидазолом пористого стекла типа «CPG/460 Glycophase G» (фирмы «Pierce»). В следующей публикации описаны особенности отобранных таким образом активных нуклеосом [Weisbrod, 1982].

Пример 8. Фишер и соавторы фиксировали на CNBr-активированной сефарозе белковый фактор элонгации EF-Tu в комплексе с GDP. Этот комплекс способен обменивать входящий в его состав GDP на (радиоактивные) GDP или GTP, но не взаимодействует с другими нуклеозид-5'-фосфатами. Имобилизованный комплекс EF-Tu-GTP избирательно связывал аминоктил-тРНК, например из смеси с избытком неаминоацилированных тРНК, проявляя таким образом специфичность, характерную для процесса элонгации молекулы белка в ходе его биосинтеза [Fisher et al., 1982].

Нуклеиновые кислоты и олигонуклеотиды в качестве лигандов

Аффинная хроматография НК на сорбентах, лигандами которых являются тоже нуклеиновые кислоты, базируется на их комплементарном взаимодействии с образованием достаточно прочных двуниевых структур — двуниевых ДНК и РНК или ДНК—РНК-гибридов. Такие структуры образуются и надежно сохраняются лишь тогда, когда строго комплементарные участки имеют протяженность в десятки нуклеотидных звеньев. Эта степень соответствия не может быть случайной, а реализуется только в том случае, когда одна из НК была синтезирована по матрице второй НК (или ей идентичной). Разумеется, как иммобилизованная НК, так и очищаемая должны быть однонитевыми, а условия связывания с сорбентом должны быть благоприятными для их гибридизации.

Вместе с тем неизбежно должно происходить образование менее совершенных двунитевых структур, когда случайное комплементарное соответствие имеет протяженность в несколько нуклеотидов или когда в более длинных комплементарных участках есть отдельные некомплементарные пары оснований. Связывание НК на нуклеиновом аффинном сорбенте в результате такого несовершенного спаривания следует считать артефактом неспецифической сорбции. Для удаления неспецифически сорбированных НК можно воспользоваться различием в прочности совершенных (специфических) и несовершенных двунитевых структур. С этой целью варьируют силу денатурирующих воздействий среды, подбирая их таким образом, что образование несовершенных двунитевых структур оказывается затрудненным при посадке вещества на сорбент, а все же образовавшиеся структуры такого рода диссоциируют при промывке. В то же время эти воздействия должны быть достаточно умеренными, чтобы не мешать образованию и сохранению совершенных, истинно комплементарных двунитевых структур. В качестве денатурирующих агентов используют обычно формамид и повышение температуры. Концентрация формамида 50% при температуре около 40° отвечает поставленным требованиям. Диссоциацию совершенных двунитевых структур при элюции очищенных (однонитевых) нуклеиновых кислот с сорбента осуществляют с помощью тех же самых агентов, повышая концентрацию формамида до 90—95%, а температуру элюента — до 60—70°.

Следует также обратить внимание на обратный (по сравнению с тем, что встречалось выше) эффект увеличения концентрации соли в элюенте. Там, где речь шла о белок-белковом или белок-нуклеиновом взаимодействии, в котором участвовало притяжение разноименно заряженных групп, увеличение концентрации соли приводило к нейтрализации зарядов и диссоциации соответствующих комплексов (неспецифическая элюция солью). Здесь же двунитевая структура удерживается за счет водородных связей между основаниями (их-то и разрывает формамид); что же касается зарядов, то одноименно заряженные остатки фосфорной кислоты в двух комплементарных нитях НК отталкиваются, что затрудняет образование двунитевых структур. Увеличение концентрации соли в этом случае способствует связыванию НК на аффинном сорбенте, а ее уменьшение помогает их элюции. После этих замечаний рассмотрим несколько типичных примеров.

Пример 9. Очистка ядерных РНК и РНП из клеток HeLa на ДНК-сефарозе [Van Eekelen et al., 1981].

Использованный в данной работе метод ковалентной посадки денатурированной (в 90%-ном формамиде) ДНК аденовируса на BrCN-активированную сефарозу был рассмотрен выше. Колонку, заполненную таким сорбентом, вначале уравнивали и выдерживали в течение 3 ч при 37° в буфере для гибридизации (50% формамида + 0,75 М NaCl + 1 мМ ЭДТА + 0,05 М Трис-HCl, pH 7,4, + + 0,5% ДДС-Na + 0,1% BSA + 0,02% поливинилпирролидона + + 0,02% фикола 400 + 1% Тритона X-100). Назначение первых

двух компонентов этого буфера пояснено выше. ЭДТА вводили для блокирования действия возможных примесей ДНКазы, БСА — для насыщения мест неспецифической сорбции на матрице, все остальные компоненты — для предотвращения такой сорбции. Частично очищенные РНК или РНП из ядер клеток HeLa растворяли в том же буфере, а затем инкубировали с суспензией ДНК-сефарозы в свободном объеме в течение 65 ч при 42°. Сорбент переносили в колонку и тщательно промывали тем же буфером при той же температуре, а затем — буфером без БСА. Элюцию очищенных, специфически связавшихся с вирусной ДНК молекул РНК и РНП вели 90%-ным раствором формамида в буфере (0,2 М NaCl + 0,1 М Трис-HCl, pH 7,4, + 0,01 мМ ЭДТА + 0,05% ДДС-Na) при температуре 70°.

В аналогичных условиях аффинной хроматографией очищали мРНК на сорбенте с ДНК, ковалентно фиксированной на диазотированной бензиллоксиметилцеллюлозе (ДБМ-целлюлозе). Отличие было лишь в том, что для насыщения мест неспецифической сорбции в буфер для предварительной промывки колонки вместо БСА вводили 0,5 мг/мл дрожжевой тРНК и 1% глицина, а детергенты не вводили. В буфере для гибридизации концентрация NaCl была увеличена до 1 М и наряду с тРНК (50 мкг/мл) присутствовало 0,2% ДДС-Na, а поливинилпирролидон и фикола отсутствовали. Элюцию мРНК вели 95%-ным раствором формамида в буфере, не содержащем NaCl, но при 37° вместо 70° [Adams et al., 1979].

Пример 10. Выделение ДНК, кодирующей синтез РНК вируса миелобластома птиц (AMV), из миелобластов цыпленка [Som, Nayak, 1978]. В данном случае авторы решали обратную задачу. Очищенную из вируса и денатурированную РНК фиксировали на BrCN-активированной сефарозе. Суммарную ДНК из миелобластов цыпленка денатурировали и одновременно освобождали от остатков РНК обработкой 0,3 М КОН (37°; 16 ч), дробили ультразвуком до фрагментов длиной около 300 нуклеотидов и сорбировали на РНК-сефарозе. 0,75 г сорбента, содержащего около 50 мкг вирусной РНК в 14 мл среды для гибридизации (50% формамида + 0,75 М NaCl + 1 мМ ЭДТА + 0,5% ДДС-Na), инкубировали со 140 мг суммарной ДНК при 50° в течение 30 ч с осторожным встряхиванием. Такое соотношение количеств ДНК и РНК-лиганда отнюдь не является избыточным, так как очищаемая вирус-специфическая ДНК содержится в суммарном препарате в соотношении 1 : 10⁶. В ходе инкубации раствор ДНК дважды отделяли от сорбента низкоскоростным центрифугированием и повторно денатурировали прогреванием до 90° в течение 3 мин, поскольку при 50° происходила частичная ренатурация ДНК. Сорбент переносили в колонку с рубашкой, промывали тем же буфером при температуре 40 и 55°, а затем элюировали ДНК, кодирующую синтез вирусной РНК, 98%-ным раствором формамида в том же буфере, но без NaCl при температуре 55°. Дальнейшая процедура этой трудной очистки включала еще один этап аналогичной аффинной хроматографии и тонкие манипуляции с использованием гибридизации ДНК с вирусной РНК и фракционирования на колонках оксипатита.

Примеры 11—13. Очистка поли(А)-РНК на поли(У)-сефарозе. Большая часть молекул информационной мРНК из самых разнообразных источников содержит на своем 3'-конце полиадениловые последовательности различной длины. В отличие от мРНК, не содержащих полиаденилата, их часто обозначают «поли(А)-РНК». Наличие полиадениловой последовательности позволяет легко выделять эти РНК из суммарных препаратов аффинной хроматографией на поли(У)-сефарозе. Сорбцию ведут в буфере, содержащем 0,2—0,5 М соли. Длинная (примерно 100 нуклеотидов) полиуридиловая последовательность сорбента в случае достаточно протяженного поли(А)-участка мРНК образует с ним столь прочную двунитевую структуру, что для элюции поли(А)-РНК приходится использовать 70—90%-ный формамид или нагревание до температуры «плавления» этой структуры. Перед посадкой на сорбент РНК целесообразно прогреть до 65—70° и быстро охладить для разрушения ее собственных двунитевых структур и агрегатов.

Так, Рикка и соавторы для очистки поли(А)-РНК из суммарной РНК печени крысы растворяли последнюю в 0,02 М NEPES-буфере (рН 7,2), содержащем 10 мМ ЭДТА и 1% ДДС-На, прогревали раствор при 65° в течение 10 мин и быстро охлаждали до 25°. Затем раствор разбавляли вдвое водой и добавляли до 0,3 М NaCl. 2400 оптических единиц (A_{260}) РНК смешивали в таком растворе с 2,5 г поли(У)-сефарозы и осторожно перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем сефарозу промывали на фильтре 70 мл того же буфера, а поли(А)-РНК элюировали 70%-ным раствором формамида в 1 мМ NEPES-буфере (рН 7,2) с 2 мМ ЭДТА. В элюате содержится РНК, сильно обогащенная поли(А)-РНК, но далеко не полностью очищенная, поэтому после переосаждения этанолом ее чистили дополнительно центрифугированием в градиенте концентрации CsCl и снова аффинной хроматографией на поли(У)-сефарозе [Ricca et al., 1981].

Прочность сорбции мРНК на поли(У)-сефарозе, очевидно, зависит от длины ее полиадениловой цепочки. Бинум и Волкин осуществляли фракционирование поли(А)-РНК из культуры клеток миеломы на колонке (0,5 × 10 см) поли(У)-сефарозы, уравновешенной 0,5 М раствором KCl в 0,005 М Трис-HCl, рН 7,6. В таком же растворе вносили и РНК, промывали 40 мл 1 М KCl, а затем вели ступенчатую элюцию (по 20 мл) следующими растворами: 0,5—0,25—0,1 М KCl (все — в том же буфере), чистым буфером, 1%-ным раствором ДДС-На и, наконец, 90%-ным формамидом. Каждая ступень элюции снимала с колонки свой пик РНК.

Сравнительное исследование материала этих пиков показало, что относительное содержание поли(А) в первых четырех из них оставалось в пределах 0,8—2,3%, а длина полиадениловой цепочки не превышала 35 остатков. В РНК, элюируемой ДДС-На, полиаденилат составлял около 3%, и лишь формамид снимал РНК, в которой на долю поли(А) приходилось около 17% материала. Тем не менее длина поли(А)-последовательностей в обоих последних пиках составляла примерно 175 нуклеотидных остатков. Эти данные были

получены для цитоплазматической РНК. Результаты аналогичного анализа РНК хроматина обнаружили заметно более высокое (6 — 7,5%) содержание поли(А) в первых пяти фракциях и 19,3% — в последней, элюируемой 90%-ным формамидом. При этом длина полиадениловых цепочек в каждом из последних пиков составляла 370 остатков [Bunum, Volkin, 1980].

В другой работе такого рода суммарную РНК печени крысы вносили на колонку поли(У)-сефарозы в буфере, содержащем 0,2 М NaCl и 0,2% ДДС-Na. Элюцию вели тем же буфером, но без NaCl, увеличивая температуру ступенями: 20—42—50°. Оказалось, что первая ступень элюции снимала поли(А)-РНК в основном ядерного происхождения. Она содержит длинную поли(А)-последовательность (по оценке авторов — примерно 200 нуклеотидов), часть которой закрыта полиуридиловой последовательностью в 20—50 звеньев. Матрицей для белкового синтеза *in vitro* эта поли(А)-РНК служить не может. Две последующие ступени элюции снимали полисомальные поли(А)-РНК, по-видимому, с полиаденилатными последовательностями различной длины. Обе фракции вели синтез белка *in vitro* [Dennis, Kisilevsky, 1979].

Пример 14. Очистка поли(А)-РНК на олиго(dT)-целлюлозе [Bantle et al., 1976]. Метод очистки поли(А)-РНК из суммарной РНК полисомной аффинной хроматографией на олиго(dT)-целлюлозе пользуется чрезвычайно широкой популярностью благодаря своей простоте и эффективности. Существенным преимуществом этого сорбента по сравнению с поли(У)-сефарозой является его неуязвимость для рибонуклеаз, присутствующих, как правило, в очищаемых препаратах РНК.

Механизм очистки — такой же, как в предыдущих примерах. Поли(А)-последовательность мРНК образует с олиго(dT)-последовательностью сорбента комплекс, достаточно прочный для того, чтобы обеспечить задержание мРНК на сорбенте, в то время как рибосомальная РНК вымывается с него солевым раствором. Как указывалось ранее, закрепленная на целлюлозе цепочка политимидилата насчитывает всего 12—18 звеньев, поэтому образующаяся в присутствии соли двунитевая структура не слишком прочна и ее можно диссоциировать просто промывкой колонки бессолевым буфером. В таком простейшем варианте метод был предложен еще 10 лет назад [Aviv, Leder, 1972]. Полисомную РНК вносили на колонку олиго(dT)-целлюлозы в буфере, содержащем 0,5 М KCl и 0,01 М Трис-HCl (рН 7,5). Промывкой тем же буфером удаляли из колонки основную массу рибосомальной РНК. Затем ее промывали 0,1 М раствором KCl в том же буфере для диссоциации и удаления неспецифически сорбированных молекул РНК (диссоциации несовершенных двунитевых структур). Поли(А)-РНК элюировали чистым буфером без соли. Позже было предложено элюцию бессолевым буфером вести при температуре 40—60°, что значительно улучшает выход очищенного материала [Nakazato, Edmonds, 1974]. Кстати, если мРНК содержит короткую олигоаденилатную последовательность, то сорбировать ее лучше на холоду.

Элюируемый материал содержит еще много рибосомальной РНК (нередко больше, чем мРНК). Бантль и соавторы пришли к выводу, что основной причиной задержания рибосомальной РНК на колонке является не ее неспецифическая сорбция, а образование достаточно прочных комплексов между рРНК и фиксированной на колонке поли(А)-РНК. По-видимому, образование таких комплексов имеет отношение к взаимодействию двух типов РНК в рибосомах. Разумеется, эти комплексы можно разрушить до внесения суммарных препаратов РНК на колонку, но благодаря большому избытку рРНК они будут образовываться на ней снова.

В связи с этим была проведена двухстадийная очистка поли(А)-РНК. Первую стадию вели, как описано выше, с элюцией буфером при 50°, но с заменой KCl на NaCl, что позволило в целях подавления активности рибонуклеаз ввести в буферы 0,2% ДДС-Na и 1 мМ ЭДТА. Элюированную с колонки РНК осаждали этанолом, перерастворяли в минимальном объеме 0,01 М Трис-HCl (pH 7,5), а затем добавляли к этому раствору девять объемов диметилсульфоксида и один объем 1 М раствора LiCl в том же буфере, но содержащем еще 50 мМ ЭДТА и 2% ДДС-Na. Эту смесь прогревали 5 мин при 55°; такая обработка обеспечивала диссоциацию комплексов поли(А)-РНК-рРНК. Затем их раствор разбавляли еще раз исходным буфером, содержащим 0,5 М NaCl, и снова вносили на колонку олиго(dT)-целлюлозы для повторной очистки. На этот раз с колонки элюировалась поли(А)-РНК почти 99%-ной чистоты.

Кроме того, для аналитической очистки мРНК авторы предложили предварительно пропускать через колонку раствор тРНК для насыщения центров прочной неспецифической сорбции РНК на целлюлозе. Это существенно уменьшало потери поли(А)-РНК при последующей ее очистке. В препаративном варианте хроматографии эту операцию можно не вводить, так как абсолютные потери из-за прочной неспецифической сорбции невелики. На колонку олиго(dT)-целлюлозы в буфере, содержащем, помимо 0,5 М NaCl, еще и 0,5% ДДС-Na, можно вносить полисомы непосредственно, без предварительного выделения из них РНК. Комбинацией воздействия соли и детергента обеспечивается диссоциация рибосом на самой колонке, после чего рибосомальные белки и тРНК вымываются из нее вместе с рРНК [Pemberton et al., 1975].

Примеры 15--17. Очистка поли(А)-РНК на олиго(dT)-целлюлозе. На том же сорбенте в аналогичных условиях можно сорбировать и комплекс поли(А)-РНК со специфически связанными с ней (в полисомах или цитоплазме) белками, т. е. поли(А)-РНК. Джейн и Саркар для очистки поли(А)-РНК из постполисомных частиц (информосом) и диссоциированных полисом сажали их на олиго(dT)-целлюлозу в буфере с 0,5 М NaCl, не содержавшем ионов Mg^{2+} (0,01 М Трис-HCl, pH 7,6, + 0,5 М NaCl + 1 мМ ЭДТА + 100 мкг/мл гепарина + 0,5 мМ ФМСФ). Посадку 500 оптических единиц (A_{260}) исходного материала на 0,5—0,6 г аффинного сорбента вели в объеме на холоду с перемешиванием в течение 4—5 ч. Суспензию переносили в колонку (0,6×5 см) и промывали тем же буфером до

прозрачности при 260 нм. Промывкой колонки буфером того же состава, но без NaCl снимали поли(А)-РНК, а поли(А)-РНК элюировали 50%-ным раствором формамида в том же буфере при температуре 25° [Jain, Sarkar, 1979].

В другой работе на олиго(dT)-целлюлозе очищали меченный по РНК поли(А)-РНК, синтезированный *in vitro* в ядрах печени крысы. Условия и буфер для связывания были точно такими же, как в предыдущей работе. Промывка колонки этим буфером на холоду снимала большую часть радиоактивности (рис. 149), но поли(А)-РНК в элюате еще не было. Следующая промывка — буфером с 0,01 М KCl при температуре 2° (А) — элюировала поли(А)-РНК, содержание которой в продуктах транскрипции очень невелико. Далее вели элюцию тем же буфером, но при 45° (Б). В этом случае из колонки выходила основная масса поли(А)-РНК, а дополнительная элюция 50%-ным формамидом при 25° (В) снимала лишь небольшое его количество [Roy et al., 1979].

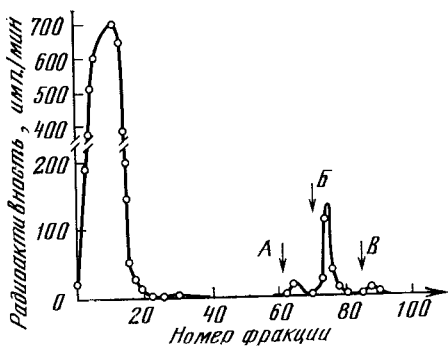


Рис. 149. Очистка поли(А)-РНК на олиго(dT)-целлюлозе (см. текст) [Roy et al., 1979]

Де Мейер и соавторы сопоставили прочность связывания поли(А)-РНК и поли(А)-РНК с олиго(dT)-целлюлозой в зависимости от концентрации NaCl, MgCl₂ и температуры. В частности, они обнаружили, что поли(А)-РНК связывается с сорбентом более чем на 80% и в буфере низкой ионной силы (0,05 М NaCl), если только в нем присутствует 5 мМ MgCl₂. Бессолевой буфер полностью снимает с колонки поли(А)-РНК при температуре 4°, а для полной элюции поли(А)-РНК температуру надо увеличить до 55°. Таким образом, оказывается, что белок в рибонуклеопротеиде увеличивает прочность связи олигоаденилата с сорбентом [De Meyer et al., 1980].

Пример 18. Использование олиго(dT)-целлюлозы для синтеза и иммобилизации ДНК, комплементарной к избранной мРНК (кДНК-колонка) [Vitek et al., 1981]. Как известно, синтез комплементарной итти ДНК (кДНК) по матрице мРНК в растворе с помощью обратной транскриптазы из вируса миелобластома птиц требует для своего осуществления наличия «затравки» — олигонуклеотида, комплементарного к фрагменту мРНК и образующего с ней двунитевую структуру на начальном участке обратной транскрипции. К этому олигонуклеотиду фосфодиэфирной связью присоединяется цепочка кДНК, синтезируемая по матрице остальной, свободной, части мРНК. Такой затравкой может служить гомополимер олиго(dT), образующий необходимый двунитевой комплекс с поли(А)-участком мРНК. Эту ситуацию можно реализовать и в том случае, когда олиго(dT) своим 5'-концом закреплен на матрице, т. е. использовать для такого синтеза продажный сорбент «Oligo(dT)cellulose».

В качестве первого этапа на сорбенте фиксируют, как описано выше, пужиную поли(А)-РНК. Его уравнивают буфером, содержащим дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, обратную транскриптазу и другие компоненты, необходимые для синтеза кДНК, и инкубируют при 37°. Затем мРНК удаляют элюцией формамидом при повышенной температуре и получают аффинный сорбент с иммобилизованной на нем кДНК.

600 мкг суммарной мРНК дрозофилы сорбировали на 360 мг олиго(dT)-целлюлозы в растворе следующего состава: 0,1 М КСl + 0,05 М Трис-НСl (рН 8,3) + 10 мМ MgCl₂ + 20 мМ ДТТ + 0,6 мМ dTTP + (по 0,4 мМ) dATP, dGTP и dCTP + 4 мМ пироглутамата Na + 1,14% этанола. Синтез кДНК начинали внесением на колонку 550 ед./мл обратной транскриптазы AMV и 20 мкг/мл ³H-dGTP. Смесь инкубировали 1 ч при 37°, переносили в колонку, термостатированную при 40°, промывали сначала 0,01 М Трис-НСl (рН 7,6), содержащим 50% формамида, 0,6 М NaCl и 0,1% ДДС-Na, а затем снимали мРНК промывкой тем же раствором формамида, но в отсутствие соли и при температуре 60°.

С помощью такой «кДНК-колонки» Витек и соавторы очищали мРНК, индуцированную в клетках дрозофилы действием гормона экистерона. Синтезируя описанным способом колонку кДНК с помощью мРНК из не обработанных гормоном клеток, они задерживали на ней все «нормальные» мРНК из клеток, индуцированных гормоном, и таким образом добивались значительного обогащения препарата специфической мРНК, синтезированной под воздействием гормона.

Недавно опубликован подробный обзор, посвященный использованию олиго(dT)-целлюлозы и других методов очистки мРНК эукариотов [Taylor, 1979].

Лиганды на основе красителей

Назовем еще некоторые варианты аффинных сорбентов для НК, где в качестве лигандов использовались красители. Был описан, например, сорбент, полученный путем иммобилизации бромистого этидия на BrCN-активированной сефарозе [Thomas, Schechter, 1978]. Бромистый этидий можно закрепить и на готовых полиакриламидных матрицах типа «Bio-Gel Р». Хотя полимеризация в таких гелях как будто закончена, в присутствии N,N'-метиленбисакриламида, персульфата аммония и ТЕМЕД они способны ковалентно присоединять бромистый этидий (возможно, по концам нитей полимера). Было предложено использовать такой сорбент для извлечения ДНК и РНК из гелей после электрофореза [Vasek et al., 1982]. Опираясь на известную избирательность бромистого этидия в отношении интеркаляции в линейные и суперскрученные ДНК, а также различия в силе его взаимодействия с ДНК и РНК, сорбенты на основе этого красителя, вероятно, можно использовать не только для очистки, но и для фракционирования НК.

Колонку, заполненную продажным сорбентом на базе акридинового желтого («Acridine Yellow ED gel» фирмы «Boehringer»), использовали для выделения суперскрученных кольцевых плазмидных ДНК из смеси с линейными ДНК бактерии-хозяина [Vincent, Goldstein, 1981].

Боскетти и соавторы описывают метод фракционирования олигонуклеотидов хроматографией на акрифлавин-агарозе [Boschetti et al., 1982]. Аффинные сорбенты на базе полиакриламида и красителей «Phenyl Neutral Red» и «Malachite Green» [Bünemann, Muller, 1978] могут быть использованы для фракционирования нуклеиновых кислот и их фрагментов по процентному содержанию в них ГЦ-пар нуклеотидов. В этом случае элюцию ведут линейными градиентами концентрации солей. В частности, таким образом можно отделять ГЦ-богатую сателлитную ДНК или фракционировать рестриктные фрагменты ДНК фага λ , нуклеотидный состав которых значительно изменяется по длине молекулы ДНК. Большого распространения методы аффинной хроматографии нуклеиновых кислот на иммобилизованных красителях не получили.

Иммуносорбенты для НК

Многочисленные примеры из обширной области использования иммуносорбентов обоих типов (с иммобилизованными антителами и антигенами) были приведены в предыдущей книге данной серии [Остерман, 1983], поэтому мы ограничимся лишь тремя примерами, относящимися к рассматриваемой проблеме аффинной очистки нуклеиновых кислот. С помощью иммуносорбентов здесь удастся решить довольно своеобразные задачи.

Пример 19. Аффинная очистка ДНК—РНК-гибридов [Stumph et al., 1978]. Кролика иммунизировали смесью двунитевого синтетического полинуклеотида «Poly(rA)·poly(dT)» фирмы «Collaborative Research» и метилированного БСА. Метилированный по карбоксильным остаткам альбумин образует комплексы с полинуклеотидами. IgG из иммунной сыворотки очищали, как обычно, осаждением сульфатом аммония и пропусканием через колонку ДЭАЭ-целлюлозы. Затем его раствор подавали на соединенные последовательно колонки с уже знакомыми нам аффинными сорбентами — ДНК-сефарозой, олиго(dT)-целлюлозой и поли(rA)-сефарозой. На них задерживаются антитела к ДНК, олиго(dT) и поли(rA), которые содержатся в исходной полиспецифической иммунной сыворотке. В растворе IgG остаются (наряду с прочими) антитела, специфичные только к гибридным молекулам. Они способны образовывать не только прочный иммунный комплекс с исходным гибридом — поли(rA)·поли(dT), но и связывать, хотя и менее прочно, любые ДНК—РНК-гибриды.

Аффинный сорбент готовили, как обычно, фиксацией IgG на BrCN-активированной сефарозе. Если на такой сорбент посадить смесь фрагментов нуклеиновых кислот, включающую в себя и ДНК—РНК-гибриды, то ступенчатая элюция 1 М NaCl, 3 М и 5 М NaSCN (все — в фосфатном буфере) удаляет сначала прочие фрагменты, а затем на последней ступени — истинные ДНК—РНК-гибридные молекулы. С помощью такого сорбента авторы добивались обогащения ядерной ДНК из *Dictyostelium discoideum* фракцией рибосомальных генов. Фрагментированную двунитевую ДНК гибридизовали с 17S и 26S РНК в условиях, благоприятствующих

образованию так называемых «R-петель» (67% формамида + 0,5 M NaCl; инкубация 45 мин при 50° и быстрое замораживание раствора). В этих условиях двунитевые структуры ДНК раскрываются и рибосомальные РНК гибридизуются с кодирующими нитями своих генов. Обработанные таким образом препараты загружали на иммуносорбент, который позволял отобрать из всей массы ДНК только участки, содержавшие ДНК—РНК-гибриды, т. е. рибосомальные гены с их непосредственным окружением. В следующей публикации тех же авторов даны некоторые усовершенствования описанного метода [Stumph et al., 1979].

Пример 20. Аффинный сорбент для двунитевых РНК [Kitagawa, Okuhara, 1981]. Кролика иммунизировали двунитевым синтетическим рибополинуклеотидом поли(И)-поли(С) также в комплексе с метилированным альбумином. Для очистки антител, специфических к двунитевым рибонуклеотидным структурам, полиспецифическую иммунную сыворотку смешивали с двунитевым рибополинуклеотидом поли(А)-поли(У), инкубировали сначала 30 мин при 37°, а затем — двое суток на холоду. Специфические иммунные комплексы осаждали центрифугированием, диссоциировали в 0,01 M NH_4OH с 5% ДМСО и фракционировали на колонке ДЭАЭ-целлюлозы. Специфические антитела элюировали с колонки 0,55 M NaCl, в то время как комплекс поли(А)-поли(У) еще задерживался на колонке. Далее проводили иммобилизацию очищенных антител с целью получения аффинного сорбента. В данной работе использовали активированную обработкой BrCN целлюлозу. На 1 г целлюлозы удавалось посадить около 3,5 мг антител.

Колонка, заполненная таким сорбентом и уравновешенная 0,15 M NaCl в 0,01 M Трис-HCl (pH 7,6), не задерживала нативную и денатурированную ДНК, любой синтетической однонитевой гомополинуклеотид, а также тРНК и 5S РНК, зато рибосомальная РНК E. coli сорбировалась на ней примерно на 50%. Эту РНК можно было элюировать 1 M раствором NaCl в том же буфере. На модельных олигонуклеотидах было показано, что прочность сорбции зависела от длины двунитевого участка модельного комплекса.

Описанный аффинный сорбент удобно использовать для извлечения вирусных двунитевых РНК из суммарного препарата нуклеиновых кислот хозяина, как было показано на примере очистки РНК вируса карликовости риса («rice dwarf virus») из смеси нуклеиновых кислот зараженного растения.

Отметим, что на эффективность иммуносорбента с иммобилизованными антителами может существенным образом влиять выбор спейсера. Он должен способствовать созданию оптимальных стерических условий, при которых взаимодействие антитела с антигеном оказывается достаточно избирательным, но образующийся иммунный комплекс не слишком прочен, что облегчает элюцию очищенного антигена [Cason et al., 1976]. В этом плане показателен следующий пример.

Пример 21. Очистка тРНК, содержащих минорный нуклеотид N⁶-изопентениладенозин (i^bA), на колонке с закрепленными ан-

тителами против i^A [McLennan, Ranev, 1983]. Авторы сопоставили несколько способов ковалентного закрепления антител на агарозной матрице. Наиболее широко употребительный способ посадки антител — на BrCN-активированную агарозу — в данном случае оказался весьма несовершенным: на 1 мл матрицы удавалось посадить лишь 1.98 мг антител, а количество тРНК, которое задерживалось на сорбенте, не превышало 0,69 опт. ед. (A_{257}) в расчете на 1 мг фиксированных антител. Это можно сопоставить с цифрами для наилучшего из обследованных вариантов, когда антитела сначала «сажали» на «Protein A-agarose» за счет известного сродства антител к белку А [Остерман, 1983], а затем фиксировали ковалентно с помощью «сшивающего агента» — 2-иминотиолана. В этом случае с 1 мл матрицы связывалось 24,7 мг антител, а тРНК сорбировались на колонке в количестве 16 ед. A_{257} на 1 мг антител. Таким образом, был получен выигрыш в емкости иммуносорбента почти в 300 раз.

АФФИННАЯ ЭЛЮЦИЯ С ИОНООБМЕННИКА

Коснемся здесь вкратце метода, который нередко относят к аффинной хроматографии, хотя по существу он является одним из вариантов не аффинной, а ионообменной хроматографии.

Речь пойдет об аффинной элюции вещества с ионообменника. Термин «аффинная элюция» мы намеренно сохранили именно для этого случая во избежание терминологической путаницы, хотя его нередко можно встретить в литературе при описании процессов биоспецифической конкурентной элюции вещества с истинно аффинных сорбентов.

Напомним, что в ионообменной хроматографии связывание вещества с сорбентом обусловлено (главным образом) электростатическими силами притяжения разноименно заряженных ионогенных групп матрицы и вещества. Если в раствор элюента при ионообменной хроматографии ввести молекулы лиганда, обладающие аффинным сродством к хроматографируемому веществу, то это может привести к ослаблению ионного взаимодействия и элюции вещества с ионообменника. Ослабление может быть обусловлено непосредственным блокированием участвующих во взаимодействии с обменником ионогенных групп вещества (особенно, если растворенный лиганд сам несет заряд, одноименный с зарядом сорбента) или такими изменениями конфигурации молекул вещества при образовании аффинного комплекса с лигандом, которые уменьшают степень экспонированности его ионогенных групп.

Аффинная элюция с ионообменников была подробно рассмотрена и иллюстрирована наглядными примерами в обзорных публикациях [Pogell, Sarngadharan, 1971; Von der Haar, 1974].

В качестве недавнего примера укажем на работу [Davies, Scopes, 1981], где на одной колонке карбоксиметилцеллюлозы методом ступенчатой аффинной элюции фракционировали целый ряд ферментов цикла трикарбоновых кислот из гомогената сердца быка. Суммарный препарат гомогената после частичной очистки осаждением сульфатом

аммония и обессоливания гель-фильтрацией вносили на колонку КМ-целлюлозы в буфере с pH 6. Ступенчатую элюцию осуществляли комбинацией постепенного подщелачивания буфера (до pH 8) и введения в элюент малых концентраций субстратов или коферментов соответствующих ферментов. Так, для элюции цитратсинтетазы вводили до 0,5 мМ щавелевоуксусной кислоты, аконитазы — 0,5 мМ аконитовой кислоты. Изоцитратдегидрогеназу снимали с помощью 0,2 мМ НАДФ⁺. Сукцинил-КоА-синтетазу элюировали комбинацией 0,2 мМ янтарной кислоты, 0,2 мМ GTP и 0,1 мМ КоА, нуклеотиддифосфаткиназу — смесью (по 0,1 мМ) ADP и АТР, фумаразу — 0,2 мМ яблочной кислоты, малатдегидрогеназу — 0,2 мМ НАДН и, наконец, аспаратаминотрансферазу — комбинацией аспарагиновой и α -оксиглутаровой кислот (по 2 мМ).

Довольно часто аффинную элюцию используют для очистки аминоацил-тРНК-синтетаз. Таким способом, например, вели очистку аргинил-тРНК-синтетазы *E. coli* на колонке фосфоцеллюлозы [Charlier, Gerbo, 1979]. Элюцию осуществляли линейным градиентом концентрации суммарной тРНК (0—25 мкг/мл).

При очевидном выигрыше в избирательности очистки всем методам аффинной элюции присущ один недостаток — они относительно дороги ввиду необходимости использовать в элюенте чистые препараты субстратов или кофакторов, хотя и в небольшой (как видно из примеров) концентрации.

АФФИННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

В заключение ограничимся упоминанием (поскольку он еще дальше отстоит от аффинной хроматографии) метода аффинного электрофореза. Суть его состоит в том, что в ПААГ или гель агарозы заполимеризовывают (часто в ограниченном слое геля) аффинный сорбент для определенного белка или же химически связывают с гелем аффинный лиганд. Когда в пластине или трубке такого геля ведут электрофорез смеси белков, то компоненты смеси, обладающие родством к сорбенту или лиганду, задерживаются благодаря аффинному взаимодействию, что облегчает их отделение или идентификацию. Этот прием уже был рассмотрен в предыдущей книге данной серии при описании перекрестного иммуноэлектрофореза. С подробностями его использования читатель может познакомиться в ряде недавно опубликованных работ [Bis-Hansen et al., 1977; Tichá et al., 1978; Johnson et al., 1980; Poreji et al., 1982].

ЛИТЕРАТУРА

- Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983.
- Abdella P. M., Smith P. K., Roy-ackerman S., Cool B., Furth J. J., Adams S. L., Alwine J. C., Crombrug-
er G. P. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, 87, p. 734—742.
- Johnson et al., 1980; Poreji et al., 1982].

- gle B., Pastan I.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 4935—4938.
- Alberts B., Herrick G.—Meth. Enzymol., 1971, 21, p. 198—217.
- Allfrey V. G., Inoue A.—Meth. Cell Biol., 1978, 17, p. 253—270.
- Arndt-Jovin D. J., Jovin T. M., Bähr W. et al.—Europ. J. Biochem., 1975, 54, p. 411—418.
- Avir H., Leder P.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1972, 69, p. 1408—1412.
- Azzi A., Bill K., Broger C.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1982, 79, p. 2447—2450.
- Bajwa W., Birnie G. D., Knowler J. T.—Nucl. Acids Res., 1982, 10, p. 3541—3560.
- Ballario P., Mauro E., Giuliani C., Pedone F.—Europ. J. Biochem., 1980, 105, p. 225—234.
- Bantle J. A., Naxwell I. H., Hahn W. E.—Anal. Biochem., 1976, 72, p. 413—427.
- Bärzu O., Michelson S.—FEBS Lett., 1983, 153, p. 280—284.
- Bearden J. C.—J. Biochem. and Biophys. Meth., 1980, 2, p. 37—47.
- Beebee T. J., Carty D. S.—Anal. Biochem., 1980, 101, p. 7—14.
- Bendich A. J., Bolton E. T.—Meth. Enzymol., 1968, 12B, p. 635—640.
- Bergenhem N., Carlsson U., Hansson C.—Anal. Biochem., 1983, 134, p. 259—263.
- Bethell G. S., Ayers J. S., Hancock W. S., Hearn M. T. W.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 2572—2574.
- Biagioni S., Sisto R., Ferraro A. et al.—Anal. Biochem., 1978, 89, p. 616—619.
- Bittner M., Burke R. L., Alberts B. M.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 9565—9572.
- Bøc-Hansen T. C., Bjerrum O. J., Brogren C.-H.—Anal. Biochem., 1977, 81, p. 78—87.
- Bodwell J. E., Meyer W. L.—Biochemistry, 1981, 20, p. 2767—2777.
- Boschetti E., Girot P., Staub A., Egly J.-M.—FEBS Lett., 1982, 139, p. 193—196.
- Brocklehurst K., Carlsson J., Kierstan M. P. J., Crook E. M.—Meth. Enzymol., 1974, 34, p. 531—544.
- Bünemann H., Müller W.—Nucl. Acids Res., 1978, 5, p. 1059—1074.
- Bünemann H., Westhoff P., Herrmann R. C.—Nucl. Acids Res., 1982, 10, p. 7163—7180.
- Bynum J. W., Volkin E.—Anal. Biochem., 1980, 107, p. 406—411.
- Bywater R., Gustavsson J.-G.—J. Biochem. and Biophys. Meth., 1980, 2, p. 49—61.
- Caron M., Faure A., Cornillot P.—Anal. Biochem., 1976, 70, p. 295—301.
- Chan Y.-L., Ulbrich N., Ackerman E. J. et al.—J. Biol. Chem., 1982, 257, p. 2522—2527.
- Charlier J., Gerbo E.—Biochemistry, 1979, 18, p. 3171—3179.
- Chibata I., Tosa T., Matuo Y.—Meth. Enzymol., 1974, 34, p. 267—271.
- Cohen L. A.—Meth. Enzymol., 1974, 34, p. 102—108.
- Cox M. M., McEntee K., Lehman I. R.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 4676—4678.
- Craney C. L., Goffredo M. E.—Anal. Biochem., 1983, 128, p. 312—316.
- Cuatrecasas P., Anfinsen C. B.—Meth. Enzymol., 1971, 22, p. 345—378.
- Cudny H., Zaniwski R., Deutscher M. P.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 5627—5632.
- Cueni L. B., Bazzone T. J., Riordan J. F., Valee B. L.—Anal. Biochem., 1980, 107, p. 341—349.
- Dahmus M. E.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 3319—3325.
- Dale R. M. K., Ward D. C.—Biochemistry, 1975, 14, p. 2458—2470.
- Dale R. M. K., Martin E., Livingston D. C., Ward D. C.—Biochemistry, 1975, 14, p. 2447—2458.
- Davies J. R., Scopes R. K.—Anal. Biochem., 1981, 114, p. 19—27.
- Davison B. L., Leighton T., Rabinowitz J. C.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 9220—9226.
- Delers F., Lombart C., Domingo M., Musquera S.—Anal. Biochem., 1981, 118, p. 353—357.
- De Meyer P., De Herdt E., Kondo M., Slegers H.—J. Biochem. and Biophys. Meth., 1980, 2, p. 311—314.
- Dennis J., Kisilevsky R.—Biochim. et biophys. acta, 1979, 561, p. 421—434.
- Farmer E. E., Easterby J. S.—Anal. Biochem., 1982, 123, p. 373—377.
- Feist P. L., Danna K. J.—Biochemistry, 1981, 20, p. 4243—4249.
- Ferraro A., D'Erme M., Cinquepalmi M. et al.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, 106, p. 961—966.
- Fickenscher K., Scheibe R.—Biochim. et biophys. acta, 1983, 799, p. 249—254.
- Fiddler M. B., Gray G. R.—Anal. Biochem., 1978, 86, p. 716—724.

- Finlay T. H., Troll V., Levy M. et al.—Anal. Biochem., 1978, 87, p. 77–90.
- Fisher W., Derwenskas K.-H., Sprinzl M.—Europ. J. Biochem., 1982, 125, p. 143–149.
- Flick P. K.—J. Biochem. and Biophys. Meth., 1981, 5, p. 341–342.
- Garbers D. L.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 240–243.
- Gellinas R. E., Roberts R. J.—Cell, 1977, 11, p. 533–544.
- Golomb M., Grandgenett D. P.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 1606–1613.
- Golovina T. O., Cherednikova T. V., Mevkh A. T., Nagradova N. K.—Anal. Biochem., 1977, 83, p. 778–781.
- Grob P. M., Chadha K. C.—Biochemistry, 1979, 18, p. 5782–5786.
- Guifoye T. J.—Biochemistry, 1980, 19, p. 5966–5972.
- Haddox M. K., Russel D. H.—Biochemistry, 1981, 20, p. 6721–6729.
- Hagemer E., Boos K.-S., Schlimme E. et al.—J. Chromatogr., 1982, 268, p. 291–295.
- Harrison L. C., Itin A.—J. Biol. Chem., 1980, 255, p. 12066–12072.
- Hillson D. A.—J. Biochem. and Biophys. Meth., 1981, 4, p. 101–111.
- Holmes E. W., O'Brien J. S.—Biochemistry, 1979, 18, p. 952–958.
- Hongo S., Sato T.—Anal. Biochem., 1981, 114, p. 163–166.
- Horejši V., Ticha M., Tichý P., Holy A.—Anal. Biochem., 1982, 125, p. 358–369.
- Hughes P., Lowe C. R., Sherwood R. F.—Biochim. et biophys. acta, 1982, 700, p. 90–100.
- Jaehning J. A., Woods P. S., Roeder R. G.—J. Biol. Chem., 1977, 252, p. 8762–8771.
- Jain S. K., Sarkar S.—Biochemistry, 1979, 18, p. 745–753.
- Jergil B., Mosbach K.—Meth. Enzymol., 1974, 34, p. 261–264.
- Johnson B. J. B.—Biochemistry, 1981, 20, p. 6103–6108.
- Johnson S. J., Metcalf E. C., Dean D. D. G.—Anal. Biochem., 1980, 109, p. 63–66.
- Kim S., Nochumson S., Chin W., Paik W. K.—Anal. Biochem., 1978, 84, p. 415–422.
- Kincaid R. L., Vaughan M.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1979, 76, p. 4903–4907.
- Kitagawa Y., Okuhara E.—Anal. Biochem., 1981, 115, p. 102–108.
- Klein H., Maltzman W., Levine A. J.—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 11051–11060.
- Knight E., Fahey D.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 3609–3611.
- Kohn J., Wilchek M.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, 107, p. 878–884.
- Kohn J., Wilchek M.—FEBS Lett., 1983, 154, p. 209–210.
- Kopperschläger G., Johansson G.—Anal. Biochem., 1982, 124, p. 117–124.
- Korpela T., Hinkkanen A.—Anal. Biochem., 1976, 71, p. 322–323.
- Lascu I., Duc M., Cristea A.—Anal. Biochem., 1981, 113, p. 207–211.
- Latham K. R., Apriletti J. W., Eberhardt N. L., Baxter J. D.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 12088–12093.
- Lau P. P., Yu S.-H., Spring T. G., Gray H. B.—Biochim. et biophys. acta, 1979, 563, p. 313–319.
- Laurell C. B., Thulin E., Bywater R. P.—Anal. Biochem., 1977, 81, p. 336–345.
- Lee C.-Y., Johansson C. J.—Anal. Biochem., 1977, 77, p. 90–102.
- Lee C.-Y., Langley C. H., Burkhart J.—Anal. Biochem., 1978, 86, p. 697–706.
- Lin L. J., Foster J. F.—Anal. Biochem., 1975, 63, p. 485–490.
- Lin F. H., Papini M.—Biochim. et biophys. acta, 1979, 561, p. 383–395.
- Lindell T. D., Nichols B. P., Donelson J. E., Stellwagen E.—Biochim. et biophys. acta, 1979, 562, p. 231–239.
- Litman R. M.—J. Biol. Chem., 1968, 243, p. 6222–6233.
- Longacre S. S., Mach B.—J. Biol. Chem., 1978, 253, p. 7500–7507.
- Lowe C. R.—In: An introduction to affinity chromatography. Amsterdam: North Holland, 1979, vol. 7, pt. 2 (Ser. Lab. techn. in biochem. and mol. biol.).
- Lowe P. A., Hager D. A., Burgess R. P.—Biochemistry, 1979, 18, p. 1344–1352.
- Lowe C. R., Hans M., Spibey N., Drabble W. T.—Anal. Biochem., 1980, 104, p. 23–28.
- Lowe C. R., Small D. A. P., Atkinson A.—Intern. J. Biochem., 1981, 13, p. 33–40.
- Lutter L. C.—J. Biol. Chem., 1982, 257, p. 1577–1578.

- Margel S.*—FEBS Lett., 1982, 145, p. 341—344.
- Margel S., Offarim M.*—Anal. Biochem., 1983, 128, p. 342—350.
- Matspalu E., Ustav M., Villems R.*—Europ. J. Biochem., 1982, 124, p. 269—273.
- Matsumoto I., Ito Y., Seno N.*—J. Chromatogr., 1982, 239, p. 747—754.
- McCutchan T. F., Gilham P. T., Söll D.*—Nucl. Acids Res., 1975, 2, p. 853—864.
- McGinnis J. F.*—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, 116, p. 689—695.
- McLennan B. D., Raney J. P.*—J. Biol. Chem., 1983, 258, p. 7592—7596.
- Mizuno S., Cor R. F.*—Biochemistry, 1979, 18, p. 2049—2056.
- Morgan M. R. A., Slater N. A., Dean P. D. G.*—Anal. Biochem., 1979, 92, p. 144—146.
- Morgan M. R. A., George E., Dean P. D. G.*—Anal. Biochem., 1980, 105, p. 1—5.
- Moss L. G., Moore J. P., Chan L.*—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 12655—12658.
- Nakazato H., Edmonds M.*—Meth. Enzymol., 1974, 29, p. 431—443.
- Nehls P., Renz M.*—Anal. Biochem., 1980, 107, p. 124—127.
- Nikon K., Larson P. O.*—Anal. Biochem., 1983, 134, p. 60—72.
- Nilsson K., Mosbach K.*—Europ. J. Biochem., 1980, 112, p. 397—402.
- Nilsson K., Mosbach K.*—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, 102, p. 449—457.
- Nishikawa A. H., Bailon P.*—Anal. Biochem., 1975, 64, p. 268—275.
- Noyes B. E., Stark G. R.*—Cell., 1975, 5, p. 301—310.
- Nygård O., Westermann P., Hultin T.*—Biochim. et biophys. acta, 1980, 608, p. 196—200.
- O'Carra P., Barry S., Griffin T.*—Meth. Enzymol., 1974, 34, p. 108—126.
- Ovchinnikov L. P., Seriakova T. A., Avanesov A.* et al.—Europ. J. Biochem., 1978, 90, p. 517—525.
- Pace B., Pace N. R.*—Anal. Biochem., 1980, 107, p. 128—135.
- Parikh I., March S., Cuatrecasas P.*—Meth. Enzymol., 1974, 34, p. 77—102.
- Pemberton R. E., Liberti P., Baglioni C.*—Anal. Biochem., 1975, 66, p. 18—28.
- Pflugfelder G., Sonnenbichler J.*—FEBS Lett., 1978, 93, p. 361—364.
- Pierre M., Loeb J. E.*—Biochim. et biophys. acta, 1982, 700, p. 221—228.
- Pirotta V., Bickle T. A.*—Meth. Enzymol., 1980, 65, p. 89—95.
- Pogell B. M., Sarnagadharan M. G.*—Meth. Enzymol., 1971, 22, p. 379—385.
- Porath J., Axén R.*—Meth. Enzymol., 1976, 44, p. 19—45.
- Porath J., Olin B.*—Biochemistry, 1983, 22, p. 1621—1630.
- Potter H., Dressler D.*—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1980, 77, p. 2390—2394.
- Ramadoss C. S., Steczko J., Uhlig J. W.*—Anal. Biochem., 1983, 130, p. 481—484.
- Rascati R. J., Parsons P.*—J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 1586—1593.
- Reff M. E., Davidson R. L.*—Nucl. Acid Res., 1979, 6, p. 275—287.
- Reyes P., Sandquist R. B.*—Anal. Biochem., 1978, 88, p. 522—531.
- Ricca G. A., Hamilton R. W., McLellan J. W.* et al.—J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 10362—10368.
- Ross D. A., Yen R.-W., Chae C.-B.*—Biochemistry, 1982, 21, p. 764—771.
- Roy S. K., Kundu S. K.*—Anal. Biochem., 1979, 98, p. 238—241.
- Roy R. K., Lau A. S., Munro H. N.* et al.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1979, 76, p. 1751—1755.
- Rubin R. A., Modrich P.*—Meth. Enzymol., 1980, 65, p. 96—104.
- Sarantoglou V., Imbault P., Weil J. H.*—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, 93, p. 134—140.
- Sarapuu T., Villems R.*—Europ. J. Biochem., 1982, 124, p. 275—284.
- Schaller H., Nüsslein C., Bonhoeffer F. J.* et al.—Europ. J. Biochem., 1972, 26, p. 474—481.
- Schnaar R. L., Sparks T. F., Roseman S.*—Anal. Biochem., 1977, 79, p. 513—525.
- Schneider C., Newman R. A., Sutherland D. R.* et al.—J. Biol. Chem., 1982, 257, p. 10766—10769.
- Schurz H., Rüdiger H.*—Anal. Biochem., 1982, 123, p. 174—177.
- Scheldon R., Jurale C., Kates J.*—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1972, 69, p. 417—421.
- Seed B.*—Nucl. Acids Res., 1982, 10, p. 1799—1810.
- Siddell S. G.*—Europ. J. Biochem., 1978, 92, p. 621—629.

- Sikorska M., Whitfield J. F.*—Biochim. et biophys. acta, 1982, **703**, p. 171—179.
- Silverman S., Schmidt O., Söll D., Hovemann B.*—J. Biol. Chem., 1979, **254**, p. 10290—10294.
- Slobin L. I.*—Europ. J. Biochem., 1979, **96**, p. 287—293.
- Smith I., Smith H., Pitko S.*—Anal. Biochem., 1972, **48**, p. 27—32.
- Smith M. M., Reeve A. E., Huang R. C. C.*—Biochemistry, 1978, **17**, p. 493—500.
- Smith R. G., d'Istria M., Van N. T.*—Biochemistry, 1981, **20**, p. 5557—5565.
- Smith K., Sundaram T. K., Kernick M., Wilkinson A. E.*—Biochim. et biophys. acta, 1982, **708**, p. 17—25.
- Som K., Nayak D. P.*—Anal. Biochem., 1978, **87**, p. 527—539.
- Spillman T., Giachero D., Hager L. P.*—J. Biol. Chem., 1979, **254**, p. 3100—3104.
- Srere P. A., Uyeda K.*—Meth. Enzymol., 1976, **44**, p. 11—19.
- Stepanov V. M., Rudenskaya G. N., Gaida A. V., Osterman A. L.*—J. Biochem. and Biophys. Meth., 1981, **5**, p. 177—186.
- Sternbach H., Engelhardt R., Lezins A. G.*—Europ. J. Biochem., 1975, **60**, p. 51—55.
- Stumph W. E., Wu J.-R., Bonner J.*—Biochemistry, 1978, **17**, p. 5791—5798.
- Stumph W. E., Wu J.-R., Bonner J.*—Biochemistry, 1979, **18**, p. 2864—2871.
- Sugiura M.*—Anal. Biochem., 1980, **108**, p. 227—229.
- Sun I. Y.-C., Allfrey V. G.*—J. Biol. Chem., 1982a, **257**, p. 1347—1353.
- Sun I. Y.-C., Allfrey V. G.*—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1982b, **79**, p. 4589—4593.
- Taylor J. M.*—Annu. Rev. Biochem., 1979, **48**, p. 681—717.
- Thomas K. A., Schechter A. N.*—Anal. Biochem., 1978, **91**, p. 209—223.
- Thomas A., Goumans H., Ames H.* et al.—Europ. J. Biochem., 1979, **98**, p. 329—337.
- Thompson S. T., Cass K. H., Stellwagen E.*—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1975, **72**, p. 669—672.
- Tichá M., Hořejší V., Barthola J.*—Biochim. et biophys. acta, 1978, **534**, p. 58—63.
- Turkova J.* Affinity chromatography. Amsterdam: Elsevier, 1978.
- Uy R., Wold F.*—Anal. Biochem., 1977, **81**, p. 98—107.
- Vacek A. T., Bourque D. P., Hewlett N. G.*—Anal. Biochem., 1982, **124**, p. 414—420.
- Vandenheede J.-R., Yang S.-D., Merlevede W.*—J. Biol. Chem., 1981, **256**, p. 5894—5900.
- Van Eekelen C. A. G., Mariman E. C. M., Reinders R. J., Van Venrooij W. J.*—Europ. J. Biochem., 1981, **119**, p. 461—467.
- Van Muijen G. N. P., Warnaar S. O.*—Biochem. et biophys. acta, 1980, **609**, p. 483—491.
- Vincent W. S., Goldstein E. S.*—Anal. Biochem., 1981, **110**, p. 123—127.
- Vitek M. P., Kreissman S. G., Gross R. H.*—Nucl. Acids Res., 1981, **9**, p. 1191—1202.
- Von der Haar F.*—Meth. Enzymol., 1974, **34**, p. 163—171.
- Wallace R. W., Lynch T. J., Tallant E. A., Cheung W. Y.*—J. Biol. Chem., 1979, **254**, p. 377—382.
- Wang D., Moore S.*—J. Biol. Chem., 1978, **253**, p. 7216—7219.
- Wang O.-S., Wong J. T.-F.*—Anal. Biochem., 1983, **131**, p. 360—364.
- Weare J. A., Gafford J. T., Lu H. S., Erdös E. G.*—Anal. Biochem., 1982, **123**, p. 310—319.
- Weber W., Vogel C.-W., Hilz H.*—FEBS Lett., 1979a, **99**, p. 62—66.
- Weber B. H., Willeford K., Moe J. G., Piskiewicz D.*—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979b, **86**, p. 252—258.
- Weetall H. H.*—Meth. Enzymol., 1976, **44**, p. 134—148.
- Weetall H. H., Filbert A. M.*—Meth. Enzymol., 1974, **34**, p. 59—72.
- Weideli H., Gehring W. J.*—Europ. J. Biochem., 1980, **104**, p. 5—11.
- Weisbrod S. T.*—Nucl. Acids Res., 1982, **10**, p. 2017—2042.
- Weisbrod S., Weintraub H.*—Cell., 1981, **23**, p. 391—400.
- Weissbach A., Poonian M.*—Meth. Enzymol., 1974, **34**, p. 463—475.
- Wilk H.-E., Kecskemethy N., Schäfer K. P.*—Nucl. Acids Res., 1982, **10**, p. 7621—7633.
- Yamaguchi M., Tanabe K., Takahashi T.*—J. Biol. Chem., 1982, **257**, p. 4484—4489.
- Yon R. J.*—Anal. Biochem., 1981, **113**, p. 219—228.

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Тонкослойная хроматография (ТСХ; английское TLC) и предшествовавший ей метод хроматографии на бумаге до середины 70-х годов занимали центральное место в исследованиях структуры белков и нуклеиновых кислот. В последнее десятилетие эти методы были явно оттеснены электрофорезом и высокoeffективной жидкостной колоночной хроматографией при высоком давлении. Оба метода превосходят ТСХ по разрешающей способности, а второй из них — и по скорости анализа. Кроме того, в результате ЖХВД экспериментатор получает уже разделенные жидкие фракции исходного препарата, в то время как после ТСХ ему надо еще локализовать пятна на пластинке, а в случае необходимости дальнейшего анализа — выполнить длительные операции элюции из них вещества. Точное и проводимое в ходе самого фракционирования определение микроколичеств вещества во фракциях при ЖХВД, которое позволяет осуществить высокочувствительные детекторы и интегрирующие устройства современных жидкостных хроматографов, оставляет далеко позади соответствующие возможности ТСХ — ввиду плохой воспроизводимости процессов элюции из пятен и высокого уровня фона или самопоглощения в слое носителя при использовании оптических, флюоресцентных и радиоактивных методов оценки количества вещества в пятнах на пластинке без его элюции. Наконец, в препаративном варианте фракционирования количественные возможности ТСХ на несколько порядков меньше, чем у обычной колоночной хроматографии и даже у электрофореза.

Все это одно время порождало у многих исследователей предствление о неизбежности постепенного отрицания метода ТСХ, однако оно, по-видимому, оказалось ошибочным. Действительно, для точных определений содержания компонентов во фракционируемой смеси ТСХ сегодня уступает ЖХВД, но она может с ней конкурировать (а чаще — дополнять) в качестве независимого метода при решении проблем идентификации веществ. И здесь на сцену выступает главное достоинство метода ТСХ — простота и дешевизна. Что же касается решения препаративных задач, то использование практически во всех современных методах исследования радиоактивно меченных соединений привело к такому снижению необходимых количеств вещества, что препаративные возможности ТСХ оказываются во многих случаях вполне достаточными. Добавим сюда еще и очень существенный прогресс в повышении разрешающей способности метода, достигнутый в последние годы благодаря разработке новых микрогранулированных и весьма гомогенных носителей для

ТСХ, способов автоматизированного нанесения на пластинки микроколичеств препарата и новых вариантов метода, например циркулярной ТСХ. Совокупность этих новых методов иногда обозначают термином «высокоэффективная ТСХ» (ВЭТСХ; английское HPTLC). Специалисты фирм «E. Merck» и «Macherey and Nagel» — основных поставщиков носителей для ТСХ и готовых пластинок, а также фирм «SAMA G» (Швейцария) и «Desaga» (ФРГ), усилиями которых осуществлялась техническая модернизация метода, с оптимизмом смотрят на перспективы применения и дальнейшего развития ТСХ.

Такое возрождение ТСХ повлекло за собой и возобновление интереса к электрофорезу на твердых носителях (ацетилцеллюлозе и тонкослойных пластинках), уступившему было свои позиции электрофорезу в гелях и ЖХВД. Наиболее интересные результаты достигаются при сочетании такого электрофореза с ТСХ в виде двумерного фракционирования. Аналогичное сочетание с использованием электрофореза в геле возможно, но затруднительно ввиду сложности количественного переноса вещества с геля на пластинку. Впрочем, впечатляющее развитие в последнее время методов переноса веществ из гелей на фильтры («блоттинга») может привести к пересмотру этого утверждения. Ниже мы рассмотрим целый ряд примеров использования двумерного фракционирования с участием электрофореза, не фиксируя внимания на общих закономерностях последнего, поскольку он был подробно рассмотрен нами (для гелей) в одной из предыдущих книг серии, а отмечая лишь те особенности, которые характерны именно для электрофореза на твердых носителях.

Что касается самого процесса ТСХ, то здесь можно усмотреть далеко идущую аналогию с жидкостной хроматографией на колонках. Неподвижную фазу образует жидкость, связанная со слоем фиксированного на подложке гранулированного сорбента, свойства и характеристики которого близки, а иногда даже идентичны таковым для материалов, используемых в качестве носителей неподвижной фазы в колоночной хроматографии. Здесь используются те же производные целлюлозы или силикагеля, к которым надо добавить только полоски ацетилцеллюлозы. Подвижную фазу образует жидкий элюент с аналогичными, рассмотренным ранее свойствами. Неизменной остается и сущность хроматографического процесса, базирующегося на равновесном распределении вещества между неподвижной и подвижной фазами. Как и в любом хроматографическом процессе (гель-фильтрация в тонком слое была рассмотрена в гл. 4), для целей хроматографического фракционирования это распределение должно быть сильно сдвинуто в пользу неподвижной фазы. Из всех вариантов хроматографии для разделения компонентов белков и нуклеиновых кислот методом ТСХ (сами биополимеры очень редко выступают здесь в качестве объектов) практически используют только два: нормально-фазовую распределительную и ионообменную.

Основным параметром, характеризующим хроматографический процесс, при ТСХ также является фактор задержки, т. е. отношение скоростей миграции вещества и течения элюента (см. гл. 1); здесь его обычно обозначают R_F . В большинстве вариантов ТСХ в отличие

от колоночной хроматографии передний фронт элюента к моменту окончания фракционирования не успевает достигнуть противоположного старту конца пластинки. Его можно легко локализовать и измерить расстояние, пройденное фронтом, от места нанесения препарата на пластинку (x_f). Фракционируемые вещества к этому моменту тем или иным способом можно зарегистрировать на поверхности слоя носителя в виде пятен или полос. Расстояние, пройденное веществом от старта в направлении элюции (x_b), измеряют до центров крупных пятен или средних линий полос. Очевидно, что в таком варианте хроматографии отношение скоростей миграции вещества и течения элюента можно заменить отношением пройденных за одно и то же время расстояний; следовательно, $R_F = x_b/x_f$.

Тонкослойная хроматография реализуется либо с помощью закрепления сухого слоя пористого мелкогранулированного носителя неподвижной фазы толщиной 0,1—0,5 мм на одной стороне прямоугольной подложки (стеклянной, пластиковой или из алюминиевой фольги), либо на полосках крупнопористой ацетилцеллюлозы. Хроматографический процесс начинается с нанесения вблизи одного из концов пластинки (на «старте») раствора препарата в виде круглого пятна малого диаметра или тонкой полоски так, чтобы раствор полностью впитался пористым материалом носителя. Тем же концом пластинку или полоску погружают в слой жидкого элюента, налитый на дно сосуда прямоугольной формы, следя за тем, чтобы свободный уровень элюента не достигал находящегося на старте препарата (в горизонтальном варианте ТСХ на пластинку накладывают фитиль). Под действием капиллярных сил элюент начинает двигаться по всей ширине пластинки или полоски к противоположному ее концу, фронт его проходит область старта и двигается дальше, а в токе жидкости за фронтом осуществляется знакомый нам хроматографический процесс.

Этого краткого описания (ниже оно будет развернуто) достаточно для того, чтобы отметить два принципиальных отличия ТСХ от колоночной хроматографии. Во-первых, жидкий элюент мигрирует по слою сухого носителя, смачивая его, — это необходимо для обеспечения действия капиллярных сил. Отсюда следует, что формирование неподвижной жидкой фазы внутри и на поверхности гранул носителя происходит за счет элюента в ходе самого хроматографического процесса. Во-вторых, одна из поверхностей тонкого слоя пористого носителя остается открытой и с нее может идти испарение элюента. Оба отличия играют немаловажную роль как в понимании процесса ТСХ, так и в разработке методов его практической реализации, чему уделено соответствующее внимание в последующих разделах. Что же касается того обстоятельства, что поперечное сечение носителя является не кругом, а очень тонкой и длинной полоской, то оно не играет принципиальной роли в протекании хроматографического процесса при условии, что диаметр гранул мал по сравнению с шириной полоски, а слой носителя однороден и имеет везде одинаковую толщину, так что фронт элюента продвигается с одной и той же скоростью по всей ширине пластинки.

Эти вводные замечания имеет смысл завершить перечислением четырех основных областей применения ТСХ и электрофореза в тонком слое в настоящее время.

1. Двумерная и одномерная распределительная ТСХ на целлюлозных, силикагелевых и полиамидных пластинках аминокислот, их данзилированных, динитрофенильных и фенилтиогидантоиновых производных (ФТГ-АК); последнее — как основной или контрольный метод идентификации аминокислот при секвенировании белков по методу Эдмана.

2. Двумерное разделение пептидов, например гидролизатов белков, на целлюлозных и силикагелевых пластинках, где в первом (чаще первом) направлении используется электрофорез в тонком слое (ТСЭ) при кислотном рН буфера, а во втором — распределительная ТСХ. Оно применяется как для целей идентификации и сопоставления родственных белков (например, для выявления мутационных или патологических изменений), так и в качестве препаративного метода для последующего анализа аминокислотной последовательности в пептидах.

3. Двумерная и одномерная ионообменная ТСХ на пластинках импрегнированной полиэтиленгликолем целлюлозы («PEI-cellulose») и ДЭАЭ-целлюлозы нуклеозидов или нуклеотидов для определения нуклеотидного состава нуклеиновых кислот, включая идентификацию минорных нуклеозидов; элюцию ведут, как правило, солями лития или аммония, используя также вариации рН соответствующих буферов.

4. Двумерное фракционирование олигонуклеотидов: в первом направлении — электрофорезом в кислотном пиридин-ацетатном буфере на полоске ацетилцеллюлозы, во втором — гомохроматографией или элюцией солевым градиентом на пластинке ДЭАЭ-целлюлозы. Между двумя этапами, естественно, фигурирует перенос вещества с ацетилцеллюлозы на пластинку. Такое фракционирование используется в различных вариантах секвенирования нуклеиновых кислот, особенно богатых модифицированными (минорными) нуклеотидами (тРНК).

В этой последовательности и будут разобраны конкретные примеры, но сначала следует рассмотреть имеющийся в продаже ассортимент носителей для ТСХ и тонкослойного электрофореза, новейшую аппаратуру и вкратце изложить технические аспекты постановки экспериментов.

НОСИТЕЛИ ДЛЯ ТСХ И ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В ТОНКОМ СЛОЕ

АЦЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗА ДЛЯ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Ацетилирование целлюлозы благодаря этерификации большей части ее гидроксильных групп снижает склонность полученного на ее основе твердого носителя к сорбции гидрофильных веществ и сообщает ему повышенную прочность по сравнению с бумагой. Вместе с тем огра-

нижение степени ацетилирования позволяет сохранить гидрофильность материала в целом и изготавливать из него тонкие прочные пленки с крупными, занимающими до 80% общего объема порами. Такие пленки весьма удобны в качестве основы для электрофореза биополимеров.

Благодаря большим размерам и гомогенности пор миграция даже крупных макромолекул под действием электрического поля не слишком большой напряженности идет быстро, полосы или пятна очерчены резко. Белки в ацетилцеллюлозных пленках быстро прокрашиваются и отмываются от избытка красителя. Все это особенно ценно для клинических анализов белкового состава сыворотки и других физиологических жидкостей. При длине пути миграции 8—10 см и напряженности поля 20—25 В/см за 1—1,5 ч удается получить хорошо воспроизводимую, достаточно полную для диагностики картину фракционирования. Пленки из специально обработанной ацетилцеллюлозы под торговым названием «Titan III» выпускает для этой цели фирма «Helena» (США). Для решения исследовательских задач в рассмотренных ниже вариантах двумерного разделения широкое применение находит продукция фирмы «Macherey and Nagel» (ФРГ). Эта фирма предлагает около 20 типоразмеров полосок из ацетилцеллюлозной пленки толщиной 0,12 мм (от 2×15 до 3×55 и 7×40 см), а также пленки прямоугольной формы размерами 8×8 и $14,5 \times 19$ см. Фирма «Serva» выпускает пять типоразмеров полосок из ацетилцеллюлозы толщиной 0,25—0,3 мм под торговым названием «Sellogel strips».

Электрофорез проводят в обычных приборах для горизонтального электрофореза на бумаге и тонкослойных пластинках (обязательно в закрытой во избежание подсыхания пленки камере), например фирмы «CAMAG» (модели 67701 или 61000; последняя — для длинных полосок и высокого напряжения) или фирмы «Savant» (США).

【СОРБЕНТЫ ДЛЯ ТСХ

В подавляющем большинстве случаев в качестве основного материала (носителя) используют целлюлозу или силикагель. Химико-физические характеристики этих материалов приведены в гл. 2, а свойства ионообменников на основе целлюлозы подробно рассматривались в гл. 7. Все эти данные относятся и к материалам, используемым для приготовления тонких слоев на пластинках. Отличие — в использовании особо мелкогранулированных фракций (2—20 мкм). Иногда для упрочения слоя силикагеля в него подмешивают немного гипса. Кроме того, для детектирования пятен веществ, поглощающих свет в УФ-области, с обоими носителями могут быть химически связаны флуоресцентные добавки. Ниже приведены марки и краткие характеристики наиболее распространенных продажных сорбентов на основе целлюлозы и силикагеля, а также готовых пластинок с этими материалами, но сначала познакомимся еще с одним, ранее не встречавшимся типом сорбентов — на основе полиамидов.

Полиамиды — это высокомолекулярные гетероцепные соединения, содержащие в основной цепи макромолекулы повторяющиеся амидные группы —CO—NH— (подобно тому как это имеет место в полипептидной цепи белка). Их, в частности, можно получать поликонденсацией аминокислот. На основе полиамидов изготавливают синтетические волокна и ткани, а также пористый гранулированный материал, пригодный для ТСХ. В последнем случае чаще всего используют перлон (ε-аминополикапролактан). Этот же материал иногда носит наименование «найлон 6», а фирма «Macherey and Nagel» для ТСХ выпускает его под маркой «Polyamide TLC 6». Кроме того, она выпускает еще и полиамидный порошок «Polyamide TLC 6,6» на основе найлона 66 (полигексаметилдиаминадипата). Оба материала сравнительно гидрофильны в отличие от гидрофобного сорбента на основе найлона 11 той же фирмы — «Polyamide TLC 11». Все три сорбента могут поставляться и с добавкой флюорогена; в этом случае после приведенных наименований стоит обозначение «UV₂₅₄». Имеются также ацетилированные производные первых двух сорбентов.

Для приготовления пластинок в лабораторных условиях нужно взять 16 г порошка и надежно суспендировать его в 65 мл воды или метанола (для «Polyamide TLC 11»). Пластины покрывают слоем этой суспензии толщиной 0,25 мм и высушивают на воздухе при комнатной температуре.

Полиамиды, в том числе и гидрофильные, в меньшей степени гидрофильны, чем целлюлоза или силикагель. Этим обусловлено их применение для распределительной ТСХ ароматических производных аминокислот — ФТГ-АК и данзил-АК. С водными или полярными элюентами полиамидные пластинки ведут себя подобно обратноразделительной сорбентам — замедление миграции веществ вдоль них обусловлено явлением распределения между фазами. С неполярными растворителями сильнее проявляются сорбционные свойства полиамида; особенно хорошо сорбируются вещества с делокализованными π-электронами. Подробнее различные механизмы фракционирования на полиамидных и иных носителях рассмотрены в обзорной статье [Zakaria et al., 1983], хотя приведенные в ней примеры несколько устарели.

Фирма «Macherey and Nagel» выпускает и готовые пластинки на пластмассовой (полиэфирной) основе — серии «Polygram» — размерами 5 × 20, 20 × 20 и 20 × 40 см с толщиной слоя 0,1 мм («Polyamide 6» и «Polyamide 11») как с флюорогеном, так и без него и такие же пластинки с двусторонним покрытием слоем «Polyamide 6» толщиной 0,05 мм (15 × 15 см) для ТСХ на наномолярном уровне. Полиамидные пластинки выпускает также фирма «BDH» (Англия).

Мы уже начали знакомиться со справочными данными по различным сорбентам для ТСХ. Перейдем теперь к пластинкам, покрытым целлюлозой и силикагелем. Наиболее полно здесь опять представлена продукция фирмы «Macherey and Nagel», предлагающей самый широкий ассортимент. Пластины этой фирмы чаще других использовались в опубликованных за последние годы работах.

Для ТСХ используют как волокнистую, так и микрокристаллическую целлюлозу. Порошок волокнистой целлюлозы фирма «Macherey and Nagel» производит под наименованием «Cellulose MN 300», а микрокристаллической — «Cellulose AVICEL for TLC». Длина нитей волокнистой целлюлозы лежит в пределах 2—20 мкм, а размер гранул микрокристаллической — в диапазоне 20—40 мкм. Значительно меньшая, чем для бумаги, длина волокон препятствует быстрому распределению вдоль них вещества, а это приводит к более резкому, чем при хроматографии на бумаге, контуру пятен и лучшим их разрешению. Продукт с наименованием «Cellulose MN300 HR» — это волокнистая целлюлоза, промытая кислотой. Обозначение «UV₂₅₄» после наименования опять-таки указывает на добавку флюорогена.

Аналогичные материалы фирмы «Merck» называются просто «Cellulose native» и «Cellulose microcrystalline» (обе — «for TLC»). Буква F после наименования указывает на добавку двух флюорогенов — для длинноволнового (360 нм) и коротковолнового (254 нм) УФ-света.

Фирма «Whatman» поставляет порошок микрокристаллической целлюлозы «Whatman CC-41». Средний размер гранул этой целлюлозы — 8 мкм.

Для приготовления пластинок в лабораторных условиях 15 г целлюлозы типа MN 300 суспендируют с помощью блендера в 90 мл воды в течение 30—60 с (целлюлозу с добавкой флюорогена лучше суспендировать в метаноле). Суспензию наносят на пластинку (см. ниже) слоем толщиной 0,25 мм; после высыхания на воздухе образуется прочный слой толщиной 0,125 мм. Микрокристаллическую целлюлозу суспендируют так же, но не менее минуты, однако и не более 2 мин (при длительной гомогенизации начинается образование геля). Длительность и скорость гомогенизации следует строго воспроизводить от опыта к опыту, так как эти параметры сильно влияют на последующую скорость миграции веществ по пластинкам.

Готовые пластинки фирмы «Macherey and Nagel» выпускаются в той же серии «Polygram» на пластмассовых подложках таких же типоразмеров, что и полиамидные пластинки, с толщиной слоя 0,1 мм, а также на алюминиевой фольге — серия «Alugram». Пластинки, покрытые слоем волокнистой целлюлозы, имеют торговое обозначение «CEL300» и «CEL300 UV₂₅₄»; пластинки микрокристаллической целлюлозы — «CEL400» и «CEL400 UV₂₅₄». Кроме того, поставляются пластинки со слоем ацетиливированной волокнистой целлюлозы типов «CEL300-10%» и «CEL 300-30%» (проценты в наименовании означают степень ацетилирования). Фирма выпускает и серию аналогичных пластинок для ТСХ на стеклянной основе, которые обозначаются так же, но с введением дополнительных чисел 10, 25 или 50 (например, «CEL300-25 UV₂₅₄»). Эти числа указывают толщину слоя целлюлозы — соответственно 0,1, 0,25 и 0,5 мм. Пластинки с толстым слоем целлюлозы предназначены для препаративного фракционирования. Фирма «Merck» выпускает готовые пластинки только со слоем микрокристаллической целлюлозы

толщиной 0,1 мм на стеклянной и пластмассовой подложках, а также на алюминиевой фольге. Готовые пластинки с подложками последних двух типов выпускаются только одного размера (20×20 см), но зато поставляются и рулоны 20×500 см, из которых можно нарезать пластинки любого удобного размера.

Для фракционирования компонентов белков и НК методом ионообменной хроматографии в тонком слое используются почти исключительно анионообменники на основе целлюлозы — в первую очередь целлюлоза, импрегнированная полиэтиленимином (PEI), и ДЭАЭ-целлюлоза. Фирма «Macherey and Nagel» выпускает на основе волокнистой целлюлозы соответствующие порошки под торговыми названиями «Cellulose MN300 PEI» и «Cellulose MN300 DEAE», а также готовые пластинки на пластмассовой основе («Polygram») типов «CEL300 PEI», «CEL300 PEI/UV₂₅₄» и «CEL 300 DEAE». В каталоге фирмы можно найти еще один анионообменник («Cellulose MN300 ECTEOA») и катионообменник типа карбоксиметилцеллюлозы («Cellulose MN 300 CM»), а также соответствующие готовые пластинки «CEL 300 ECTEOA» и «CEL 300 CM». Фирма «Merck» выпускает порошки «DEAE-cellulose» и «CM-cellulose», а также готовые пластинки с пластмассовой подложкой, покрытые слоем (0,1 мм) PEI-целлюлозы. Эти ионообменники готовятся на основе микрокристаллической целлюлозы.

Полиэтиленимин-целлюлозу можно приготовить и в лабораторных условиях гомогенизацией в блендере суспензии MN 300 в водном 3%-ном растворе полиэтиленимина (30 г MN 300 на 200 мл) [Yeh, 1978]

Следует отметить, что для целей ионообменной хроматографии с тонкослойными пластинками до сих пор еще конкурирует ДЭАЭ-бумага, чаще всего — марки «Whatman DE-81».

Для ТСХ применяется силикагель с гранулами диаметром 2—40 мкм (средний размер пор — 60 Å). Скорость движения элюента по пластинке сильно зависит от размера гранул и составляет примерно 13 см/ч для гранул диаметром 2—10 мкм и 40 см/ч для гранул 10—30 мкм. Для улучшения сцепления с подложкой и упрочения слоя в силикагель часто добавляют 5—15% гипса. Силикагели с такой связкой обозначаются фирмой «Macherey and Nagel» как «Silica gel G», а без связки — «Silica gel N».

Как и ранее, дополнительное обозначение «HR» принято для промытого кислотой материала, а обозначение «UV₂₅₄» указывает на присутствие флюорогена (например, «Silica gel G-HR/UV₂₅₄»). Для приготовления пяти пластинок размером 20×20 см со слоем толщиной 0,25 мм 30 г силикагеля гомогенизируют в блендере в течение 30 с с 65—70 мл воды. Иногда рекомендуют предварительно растереть силикагель в ступке с малым количеством воды до состояния гомогенной пасты, а затем постепенно добавлять еще воду. Готовые пластинки сушат на воздухе. Пластинки без связки (типа «N») фирма рекомендует активировать перед использованием путем прогрева при 110° в течение 30 мин. Для тех случаев, когда присутствие ионов Ca^{2+} нежелательно, в качестве связки добавляют 3%

крахмала. Такая связка используется, в частности, для силикагельных пластинок на алюминиевой фольге размером 20×20 см типа «Silufol», выпускаемых в Чехословакии.

Готовые пластинки, покрытые слоем обычного силикагеля толщиной 0,2 или 0,25 мм, с размерами 4×8 , 5×20 , 20×20 и 20×40 см выпускаются фирмой «Macherey and Nagel» в сериях «Polygram» (на пластинке) и «Alugram» (на алюминиевой фольге) с одинаковыми обозначениями: «SILG», «SILG/UV₂₅₄», «SILN-HR» и «SILN-HR/UV₂₅₄». Смысл этих обозначений понятен из предыдущего.

Пластинки со стеклянной подложкой выпускаются только на основе силикагеля, связанного гипсом, но со слоями разной толщины, что отмечается числами 25, 50, 100 и 200, стоящими после общего обозначения «SILG», для слоев толщиной 0,25, 0,5, 1 и 2 мм соответственно. Есть вариант стеклянных пластинок с силикагелем, содержащим два флюорогена: для длинноволнового (366 нм) и коротковолнового (254 нм) УФ-света; такие пластинки обозначаются символом «SILG-25 UV₂₅₄₊₃₆₆».

Для ВЭТСХ в наномолярном диапазоне количества вещества в последние годы начали выпускать пластинки, покрытые слоем особо микрогранулированного и однородного по размерам гранул (5—10 мкм) силикагеля с таким же, как и выше, средним диаметром пор (60 Å). Фирма «Macherey and Nagel» ввела обозначения «Nano-SIL-20» — для таких пластинок на стеклянной основе с толщиной слоя 0,2 мм (размеры: 5×5 , 10×10 и 10×20 см) и «Nano-SILG» — для пластинок двух последних типоразмеров на алюминиевой фольге (серия «Alugram»). Толщина слоя связанного гипсом силикагеля — тоже 0,2 мм. Оба типа выпускаются и с флюорогеном.

Силикагели фирмы «Merck» для ТСХ поставляются в виде гранул среднего размера 15 мкм с диаметром пор около 60 Å. Реже применяются для ТСХ силикагели этой фирмы со средним диаметром пор 40 и 100 Å, поэтому диаметр пор вносится в фирменное наименование силикагеля. Наличие гипса в качестве связующего материала обозначается буквой «G», а его отсутствие — буквой «H». При наличии флюорогена далее идет буква «F» с указанием внизу длины волны возбуждения флюоресценции. Таким образом, фирменное обозначение «TLC Silica gel 60 G F₂₅₄» расшифровывается так: связанный гипсом силикагель со средним диаметром пор 60 Å, в который химически введен флюороген для коротковолнового УФ-возбуждения. Готовые пластинки такого типа со слоем обычного силикагеля толщиной 0,2 или 0,25 мм фирма «Merck» выпускает на стеклянной и пластмассовой основе, а также на алюминиевой фольге. Для фракционирования нуклеиновых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов фирма начала выпускать пластинки для ВЭТСХ на основе силикагеля, модифицированного γ-аминопропилом, под торговым обозначением NH₂F₂₅₄. Их свойства и использование рассмотрены в недавней работе [Jost, Hauck, 1983]. Пластинки для ВЭТСХ с толщиной слоя 0,2 мм поставляются (под общим наименованием «HPTLC Silica gel Merck 60») как на стеклян-

ной основе, так и на алюминиевой фольге. Надо отметить, что силикагели для ВЭТСХ обе фирмы поставляют не в виде порошков, а только в виде готовых пластинок, поскольку манипулирование с суспензиями столь микрогранулярных силикагелей в лабораторных условиях затруднительно. Добавим сюда, что фирма «Merck» начала производить пластинки для ВЭТСХ и на основе микрогранулированной целлюлозы под наименованием «HPTLC cellulose Merck» (толщина слоя — 0,1 мм; размеры — 10×10 и 10×20 см).

Этим перечнем мы и закончим знакомство с продажными сорбентами, обменниками и готовыми пластинками на их основе, отнюдь не исчерпав всего их разнообразия. Например, мы вовсе не коснулись таких сорбентов, как окись алюминия и кизельгур для ТСХ или смешанных сорбентов, а также ионообменных смол, поскольку эти материалы (и готовые пластинки на их основе) не нашли широкого применения для ТСХ и ТСЭ компонентов белков и НК.

ТЕХНИКА ТСХ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПЛАСТИНОК

Результаты, полученные методом ТСХ (а особенно — их воспроизводимость), очень зависят от неизменности толщины слоя и распределения размеров гранул, поскольку эти параметры сильно влияют на скорости течения элюента и миграции веществ. Вот почему в исследовательской практике предпочитают, если это возможно, пользоваться готовыми пластинками, промышленное производство которых хорошо стандартизовано. Если же возникает необходимость изготовления пластинок в лаборатории, то надо принять все меры для достижения однородности слоя сорбента. В качестве подложек для самодельных пластинок используют зеркальное стекло с гладкими краями. Перед нанесением слоя оно должно быть тщательно промыто детергентом и хромовой смесью. Способы приготовления и гомогенизации суспензий сорбентов указаны в предыдущем разделе. Важно иметь в виду, что при стоянии частицы суспензий незаметно для глаза оседают, так что распределение их размеров по объему становится неоднородным, поэтому наносить суспензию на пластинку надо сразу же после окончания гомогенизации. В простейшем варианте эту операцию можно осуществить с помощью пипетки с расширенным отверстием. В нее набирают заранее рассчитанный объем суспензии, быстро и более или менее равномерно распределяют его по поверхности пластинки, двумя-тремя покачиваниями во взаимно перпендикулярных направлениях обеспечивают надежное покрытие всей поверхности пластинки, а затем кладут ее на установленный строго горизонтально (по уровню) стол. С этого момента в течение получаса пластинку не следует трогать с места, но можно прикрыть ее от пыли коробкой из плексигласа. После предварительного подсушивания пластинки можно

перенести в штатив для досушивания на воздухе или активации в сушильном шкафу.

В продаже имеются различные несложные приспособления для более надежного нанесения слоя на пластинки. В конструкции фирмы «Desaga» («TLC-Spreader») несколько пластинок строго одинаковой толщины кладут в один ряд, в упор к выступающему краю установленного по уровню длинного столика. Опираясь на этот же выступ, вдоль ряда пластинок (над ними) продвигают «корытце», заполненное суспензией сорбента. Зазор между поверхностью стекла и дном корытца строго одинаков по всей ширине пластинки — его можно отрегулировать заранее. По мере передвижения корытца из прямоугольной щели в его дне вытекает суспензия, образуя слой заданной толщины. В аналогичной конструкции фирмы «CAMAG» («TLC plate coater») корытце остается неподвижным, а пластинку вручную или механически проталкивают (по направляющим) через зазор под его дном.

Несложная модификация устройства фирмы «Desaga» позволяет наносить на пластинки линейно изменяющуюся в одном направлении по своим пропорциям смесь двух сорбентов или импрегнировать сорбент линейно возрастающей концентрацией какой-либо добавки («Gradient TLC-spreader»). ТСХ нескольких идентичных препаратов в направлении, перпендикулярном к градиенту, позволяет выбрать оптимальную пропорцию смеси, а хроматография вдоль градиента открывает возможность разделения компонентов, сильно различающихся по своей подвижности (подобно тому как это происходит при электрофорезе в градиенте пористости ПААГ). Эти возможности, насколько нам известно, еще не использовались для фракционирования компонентов белков и НК, однако целесообразно иметь их в виду.

Хранить готовые пластинки следует в штативах, защищенных от пыли, в обычных атмосферных условиях (применение осушителей не оправдано), хотя после долгого хранения во влажной атмосфере может потребоваться повторная активация силикагельных пластинок.

НАНЕСЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Раствор препарата наносят на поверхность слоя сорбента на расстоянии 0,5—1,5 см от того края пластины, с которого будет начинаться миграция элюента (при вертикальной установке — с нижнего). Препарат или препараты можно наносить в виде одного пятна, находящегося близ угла пластинки (для двумерной хроматографии), в виде серии равноотстоящих от края и равноудаленных друг от друга пятен (для сопоставления картин хроматографического фракционирования), для той же цели — в виде полосок длиной 5—10 мм, поскольку разрешение близко расположенных полос на хроматограмме всегда лучше, чем так же расположенных пятен, и, наконец, в виде длинной — иногда во всю ширину пластинки — полосы (для препаративного разделения).

Последующее разрешение пятен и полос тем лучше, чем меньше диаметр исходного пятна или ширина исходной полосы. Стараются, чтобы при обычной ТСХ диаметр пятна или ширина полосы препарата на старте не превышали 3 мм; это заставляет ограничивать однократно вносимый в пятно объем препарата примерно до 2 мкл. Минимальный объем определяется необходимой точностью дозировки — для обычной ТСХ он, как правило, должен быть не менее 0,2 мкл. При ВЭТСХ диаметр пятна стараются ограничить 1 мм; соответственно наносят и примерно в 10 раз меньшие объемы (толщина слоя сорбента пластинок для ВЭТСХ примерно такая же, как у обычных пластинок для аналитической ТСХ). Если необходимо нанести большие, чем указано, объемы, то можно прибегать к повторному нанесению раствора препарата в одно пятно (или неоднократно «прочерчиванию» полосы) с промежуточным подсушиванием. Однако не рекомендуется повторять это более 3—4 раз.

Минимальное количество материала, вносимого в пятно, зависит от ожидаемого числа фракций и чувствительности метода их детектирования. Ориентировочно для обычной ТСХ — это микрограммы вещества, т. е. несколько десятков наномолей каждой аминокислоты или несколько наномолей каждого из пептидов среднего размера. Максимальная загрузка одного пятна не должна по возможности превышать 100 мкг материала (а при ВЭТСХ — соответственно меньше). В препаративном варианте загрузка одной полосы на всю ширину пластинки (20×20 см) при толщине слоя 0,25 мм может достигать 5 мг; для толстослойных пластинок (до 2 мм) эта цифра соответственно увеличивается.

Препараты для обычной ТСХ можно наносить вручную с помощью различного рода микропипеток, например констрикционных пипеток типа «л» или калиброванных капилляров типа «Microcaps». Раствор препарата выдувают или выдавливают из пипетки, максимально приблизив ее кончик к поверхности слоя, но так, чтобы не повредить его. Для равномерного (а главное, равноудаленного от края) расположения нескольких пятен удобно пользоваться шаблонами. В виде полосы препарат можно наносить равномерным движением вдоль линейки, из пипетки с мягким полиэтиленовым наконечником, проводя им (без нажима) по поверхности слоя. Однородные полосы исходного вещества для препаративного разделения удобно наносить из пипетки объемом 1 мл, в кончик которой вставлен ватный фитиль. Выступающий кончик фитиля надо обрезать наподобие наконечника фломастера. Жидкость в пипетку следует набрать в таком количестве, чтобы она свободно не выливалась. Вести фитиль по пластинке следует ровным движением, опираясь на линейку.

Все эти операции требуют определенного искусства, а в случае использования пластинок для ВЭТСХ и соответственно очень малых объемов препарата становятся плохо воспроизводимыми. Поэтому ведущие фирмы «CAMAG» и «Desaga» разработали ряд вариантов автоматических или полуавтоматических дозаторов. Само дозирование раствора препарата осуществляется с помощью

тех же калиброванных капилляров или микрошприца гамильтоновского типа. Назначение прибора состоит в обеспечении правильного расположения пятен или полосок (на одной линии, строго параллельно краю пластинки) и безопасного для слоя сорбента соприкосновения кончика пипетки или иглы шприца с поверхностью пластинки.

Фирма «СAМАG» разработала для этой цели два прибора. В сравнительно простом (полуавтоматическом) приборе «СAМАG NANOMAT» пластинку устанавливают на выдвижном столике (рис. 150). На конце Г-образного рычага укреплен втулка, в которую в металлической оправе вставляется капилляр или специальный микрошприц, объем которого устанавливается с помощью микрометрического винта. Магнитная подвеска обеспечивает деликатную операцию опускания кончика дозатора до соприкосновения мениска жидкости с поверхностью пластинки и возвращения его по окончании заданного времени опорожнения в исходное положение. После этого рычаг можно передвинуть в следующее фиксированное положение. Таким образом, одно за другим наносят все пятна на линию старта. Опорожнение капилляра идет за счет впитывания жидкости сорбентом, а шприца — вручную, нажатием соответствующего рычажка до упора. Капилляры при смене препарата заменяют, а шприц приходится промывать.

В более сложном, автоматическом дозаторе «СAМАG LINOMAT III» (рис. 151) использован другой принцип нанесения препарата. Между кончиком иглы гамильтоновского шприца и поверхностью пластинки остается небольшой зазор. Игла почти до самого конца располагается в центре трубки, по которой подается струя азота. По мере выдавливания жидкости из иглы (механически, с заданной скоростью) струя газа сдувает ее на поверхность пластинки. Таким образом, наносится пятно очень малого диаметра или узкая полоска. В последнем случае столик с пластинкой перемещается с заданной скоростью. Длину полоски (и интервал между ними) можно заранее выбрать — вплоть до 20 см. Объем препарата задается с точностью $\pm 0,05$ мкл в интервале 0,5—500 мкл. Цифровой индикатор непрерывно указывает нанесенный объем. Для смены препарата можно быстро заменить один шприц другим. Столику с пластинкой можно задать возвратно-поступательное движение, для того чтобы наносить материал исходной полоски в несколько приемов. Вариант сдувания жидкости на пластинку позволяет существенно улучшить воспроизводимость нанесения малых объемов при дозированной по времени ее подаче. Этот вариант позволяет исключить два источника ошибок дозирования: вытягивание жидкости из иглы сорбентом за счет действия капиллярных сил и подъем ее по наружной поверхности иглы.

В дозаторе фирмы «Desaga», «Microdoser 80» гамильтоновский шприц с механической подачей расположен горизонтально. Жидкость из его иглы на поверхность пластинки подается через мягкий изогнутый наконечник. Шприц вместе с моторчиком перемещается параллельно краю неподвижной пластинки. Для автомати-

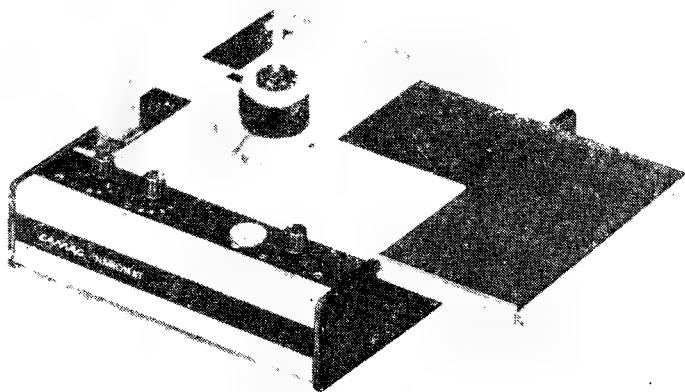


Рис. 150. Прибор «CAMAG NANOMAT»

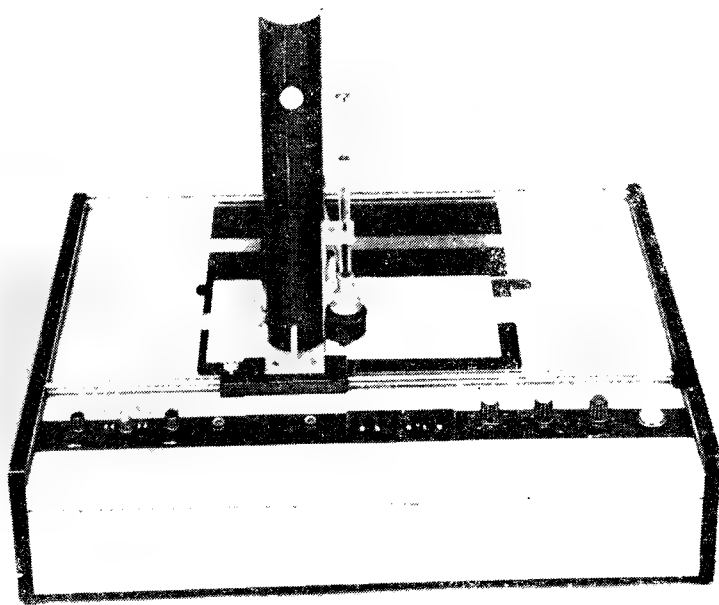


Рис. 151. Прибор «CAMAG LINOMAT III»

ческой дозировки количества препарата прибор можно укомплектовать датчиком импульсов, управляющих движением поршня шприца («Desaga Impulsomat»). Для ускорения массовых (например, клинических) анализов прибор «Desaga Autospotter» дает возможность наносить на стартовую линию пластинки 20 различных

препаратов одновременно. Заполнение 20 тефлоновых капилляров одинаковым для всех препаратов объемом, подача из них жидкости на пластинку, а также последующая промывка капилляров осуществляются с помощью 20-канального перистальтического насоса. Скорость подачи можно регулировать.

В заключение добавим, что при одномерном фракционировании нескольких препаратов имеет смысл треки их предстоящей миграции разделить, процарапав в слое сорбента бороздки по направлению элюции, — элюент будет подниматься ровнее. Полоски должны более чем на 1 см не доходить до уровня жидкости в банке, иначе элюент сможет подниматься по ним, как по капиллярам.

«ПРОЯВЛЕНИЕ» ПЛАСТИНОК (ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ЭЛЮЦИЯ)

Прежде чем описать конструкцию соответствующих устройств, отметим ряд особенностей хроматографического процесса при ТСХ, вытекающих из двух отмеченных выше принципиальных отличий его от колоночной хроматографии.

Из того факта, что элюент смачивает сухой сорбент, следует что неподвижная жидкая фаза внутри (и на поверхности) гранул сорбента формируется лишь в ходе хроматографического процесса. Для осуществления процесса распределительной хроматографии неподвижная и подвижная жидкие фазы должны отличаться по своему составу, чтобы обеспечить различие растворимостей компонентов препарата в той и другой фазе. Растворимость в неподвижной фазе должна быть выше, чем в подвижной, с тем чтобы обеспечить коэффициент распределения вещества $K > 1$ (см. гл. 1). Поскольку при ТСХ обе фазы формируются за счет одной элюирующей жидкости, последняя должна быть гомогенной смесью воды и органического растворителя (или растворителей).

Объекты анализа в нашем случае — это более или менее гидрофильные компоненты белков и нуклеиновых кислот, поэтому при их ТСХ используется нормальнофазовое распределение. Гидрофильные сорбенты по мере продвижения фронта элюента связывают из него в первую очередь воду, формируя обогащенную водой неподвижную фазу, что и обеспечивает необходимое распределение веществ между неподвижной и подвижной фазами. Следующие порции элюента постепенно вымывают компоненты смеси веществ исходного препарата, заставляя их мигрировать в направлении тока жидкости с разными скоростями в соответствии с их растворимостями, т. е. с коэффициентами распределения. Выбор состава элюента и пропорций в нем воды и различных органических растворителей диктуется стремлением создать условия для такого соотношения коэффициентов распределения всех компонентов смеси, которое обеспечило бы их успешное разделение за время прохождения фронта жидкости до конца пластинки. В создании таких условий играет роль не только простое различие степени гидрофиль-

ности или гидрофобности компонентов, но и индивидуальные особенности их взаимодействия с различными составляющими сложного растворителя, обуславливающие определенную степень избирательности растворения. Часто подбор условий (в первую очередь состава элюента) осуществляется эмпирически, на основе накопленного для аналогичных препаратов опыта. Мы не будем рассматривать пути выбора новых вариантов элюции, тем более что для интересующего нас круга задач к настоящему времени из числа очень многих вариантов практика отобрала лишь небольшое их число, по-видимому, оптимальные.

В случае ионообменной ТСХ ситуация проще: элюцию ведут с помощью водных растворов солей (или «гомосмесей» — см. ниже), а образование водной неподвижной фазы, в которой происходит обмен ионов, осуществляется без осложнений, обеспечивая тождественность неподвижной и подвижной жидких фаз.

Легко видеть, что хроматографическая ситуация при ТСХ сложнее, чем при колоночной, где элюцию можно вести объемами, во много раз превышающими свободный объем колонки, а фракции выходят одна за другой, иногда с большими интервалами. Здесь же все пятна или полосы должны распределиться по длине пластинки за время прохождения всего лишь одного «свободного объема» слоя сорбента. Движение элюента обусловлено смачиванием сухого сорбента, поэтому после достижения передним фронтом элюции края пластинки хроматографический процесс автоматически прекращается и все пятна компонентов смеси остаются на пластинке. Правда, если все они мигрируют медленно, то объем элюции можно увеличить. Для этой цели можно, например, «продлить» пластинку, прикрепив к ее противоположному от старта концу фитиль из фильтровальной бумаги (к стеклянной пластинке его можно прижать с помощью полоски плексигласа и зажимов, к пластиковой — просто пришить). Конец фитиля можно выпустить из хроматографической камеры, давая возможность жидкости с него испаряться, — в этом случае объем элюции может быть любым. Конец фитиля, если нужно, можно обдувать подогретым воздухом. Иногда из камеры выпускают конец самой пластинки и подогревают его. Второй вариант увеличения объема элюции состоит в том, что после достижения фронтом элюента края пластинки ее вынимают из камеры и высушивают, а затем возвращают в нее для повторной элюции. Кстати, это позволяет при необходимости изменить состав элюента при повторном «проявлении». Увеличение объема элюции позволяет воспользоваться менее эффективными элюентами и тем самым увеличить значения коэффициентов распределения компонентов смеси в пользу неподвижной фазы, что, как было показано в гл. 1, позволяет улучшить их разделение.

Хроматографическую пластинку, как правило, помещают в замкнутый объем хроматографического сосуда. Это связано с возможностью неравномерного испарения растворителей, входящих в состав элюента, с открытой поверхности пластинки. Более того, пары элюента могут неодинаково по длине пластинки сорбировать-

ся ее рабочим слоем и нарушать неизменность условий продвижения фронта. Для обеспечения воспроизводимых условий проявления пластинки предпочитают еще до его начала уравнивать ее в парах растворителя в замкнутом объеме хроматографического сосуда. Простейший вариант такого сосуда представляет собой прямоугольную стеклянную банку немногим большего размера, чем пластинка, шириной 5—8 см, с плоским дном и притертой плоской крышкой. Элюент наливают на дно банки слоем 5—10 мм и опускают в него пластинку стартовой стороной вниз, оперев ее на стенку банки. Удобнее вариант банки с выступом посередине дна, идущим вдоль всей ее длины. На рис. 152 показано (в разрезе) положение пластинки во время уравнивания в парах элюента и во время проявления. Для заполнения левой полости дна, в которой установлена пластинка, нет нужды открывать банку — достаточно ее легко наклонить, и часть элюента из правой полости перетечет в левую. Иногда для создания однородной атмосферы насыщенного пара боковую стенку банки покрывают листком фильтровальной бумаги, смоченной элюентом.

В некоторых случаях, наоборот, лучшее качество разделения пятен или полос получается тогда, когда слой сорбента впереди фронта элюции остается относительно сухим и в то же время за фронтом испарение с увлажненной части пластинки и конвекция паров элюента максимально затруднены. Для этой цели используют «сэндвич-камеры» («S-chambers»). На рабочий слой пластинки с минимальным воздушным зазором (через боковые прокладки) накладывают вторую пластинку, закрепляют ее зажимами и весь «сэндвич» опускают в слой элюента. Разумеется, вторая пластинка, перекрывая всю ширину рабочей, не должна доходить до ее нижнего края (и даже немного — до стартовой линии нанесения препаратов), с тем чтобы не допустить подъема жидкости в зазор между пластинками.

Скорость движения фронта элюции при ТСХ практически не зависит от расположения пластинки (эту скорость определяет соотношение капиллярных сил и силы трения жидкости, текущей между гранулами, поэтому так влияет размер гранул). Однако в некоторых случаях горизонтальное расположение пластинки предоставляет определенное преимущество. Например, оно дает возможность на одной пластинке в параллельных «треках» вести элюцию различными элюентами. Схема соответствующего прибора («CAMAG VARIO-KS Chamber») показана на рис. 153 (вверху — поперечное по отношению к направлению элюции сечение прибора). Пять (или десять) резервуаров, разделенных идущими вдоль всей длины пластинки перегородками, можно заполнить различными элюентами и наложить на них (без соприкосновения с жидкостью) пластинку рабочим слоем вниз. Предварительно по ширине резервуаров на пластинке выскребают узкие полоски сорбента, так что фактически получается пять параллельных одинаковых слоев, и наносят на старт пятна препаратов. Каждый слой вместе со своим резервуаром образует замкнутую камеру, где происходит уравни-

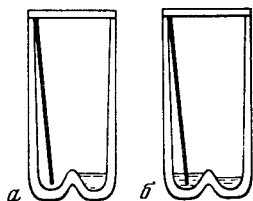


Рис. 152

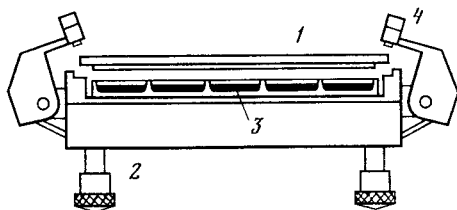


Рис. 153

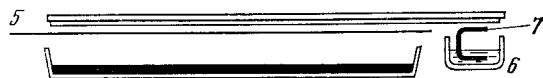


Рис. 154

Рис. 152. Сосуд для ТСХ

a — уравнивание пластинки в парах элюента; *б* — элюция (проявление)

Рис. 153. Схема конструкции прибора «VARIO-KS Chamber» фирмы «CAMAG»

1 — пластинка для ТСХ; *2* — корпус прибора; *3* — резервуары с элюентами; *4* — пружинные прижимы; *5* — выдвижная пластинка; *6* — резервуары с элюентами, используемыми для самой элюции; *7* — фитили

Рис. 154. Схема конструкции прибора «HPTLC linear developing chamber» фирмы «CAMAG»

1 — пластинка для ТСХ; *2* — защитная пластинка, образующая «сэндвич»; *3* — откидные стеклянные пластинки в камерах элюции, обеспечивающие подачу элюента к ТСХ-пластинке за счет капиллярных сил; *4* — герметизирующий колпак

шивание с соответствующим элюентом. Элюцию начинают одновременным подъемом пяти расположенных под краем пластинки карманов, из которых с помощью С-образных фитилей разные элюенты подаются к старту. После начала элюции под рабочий слой пластинки вдвигают вторую пластинку, образующую «сэндвич».

Горизонтальный вариант камеры элюции фирмы «Desaga» («Desaga BN-chamber») предназначен для другой цели. Пластинку устанавливают рабочим слоем вверх и закрывают крышкой с малым зазором, опять образуя «сэндвич». Она немного не доходит до противоположного старта края пластинки, под которым расположен нагреватель. Это, как указывалось, позволяет обеспечить испарение элюента с конца пластинки и проявление хроматограммы неограниченным объемом элюента.

Элюцию пластинок для ВЭТСХ надежнее проводить тоже в горизонтальной камере типа «сэндвич». Разрез такой камеры для прямолинейной элюции препаратов в параллельных треках изо-

бражен на рис. 154. Пластинку с нанесенными на старт препаратами (если нужно, предварительно уравновешенную в отдельном сосуде с парами элюента) кладут рабочим слоем вниз над защитной пластинкой с зазором 0,5 мм между ними, образуя «сэндвич». Препараты можно наносить и элюировать одновременно с двух краев пластинок. Для этого предусмотрены две камеры элюции объемом около 3 мл. Оригинальная и очень простая система используется для подачи элюента из камеры к рабочему слою пластинки. Вместо фитилей в обе камеры свободно опущены прямоугольные полоски стекла, занимающие всю длину камеры. Когда эти полоски устанавливают вертикально и поджимают к краям рабочей пластинки (надвигая до упора закрывающие камеры стекла), то между полосками и ближними к пластинкам стенками камер образуются тонкие щели, в которые благодаря капиллярному эффекту поднимается элюент вплоть до его соприкосновения с рабочим слоем пластинки.

Элюцию можно вести и с одного конца на всю длину пластинки. Приборы выпускаются двух типов — для пластинок размером 5×5 и 10×10 см. Хроматографическое фракционирование на ВЭТСХ-пластинках дает выигрыш не только в разрешении пятен (благодаря малому размеру гранул и малому диаметру исходного пятна), но и во времени разделения — оно обычно занимает от нескольких минут до получаса.

Описанный прибор предназначен для прямолинейной элюции в параллельных треках. Может показаться, что это само собой разумеется, однако для ВЭТСХ используется (и имеет свои преимущества) и другой вариант элюции — радиальный. Его осуществляют на тех же самых пластинках размером 5×5 или 10×10 см, но в специальном приборе «CAMAG U-chamber system» (рис. 155, 156). Квадратную пластинку (1) зажимают в кольцевую оправу (2) и устанавливают рабочим слоем вниз на камеру, имеющую форму широкой воронки (3). Через капилляр (4) диаметром 0,2 мм с помощью шприца (5) с заданной скоростью в центр пластинки подается элюент. Каналы (6) и (7) служат для подачи и отвода газовой фазы, например насыщенных паров элюента. Из канала (6) газ заполняет кольцевую канавку (8), а уже из нее по всей периферии пластинки поступает в камеру.

В простом варианте радиальной хроматографии препараты предварительно наносят пятнами или сплошным кольцом по окружности в некотором отдалении от центра пластинки (рис. 157). Это можно осуществлять вручную по шаблону или с помощью прибора «NANOMAT», в который вместо выдвигаемого столика устанавливают кольцевую оправу с пластинкой. Рычаг с магнитной головкой фиксируют в положении, когда кончик микрошпигетки отстоит на нужное расстояние от центра пластинки, и после нанесения каждого пятна поворачивают подвижный диск оправки вместе с пластинкой на выбранный угол. Элюент с заданной постоянной скоростью подается в центр пластинки с помощью шприца. Капиллярные силы, действующие одинаково во всех направлениях, формируют кольцевой фронт элюции — от центра пластинки к периферии по-

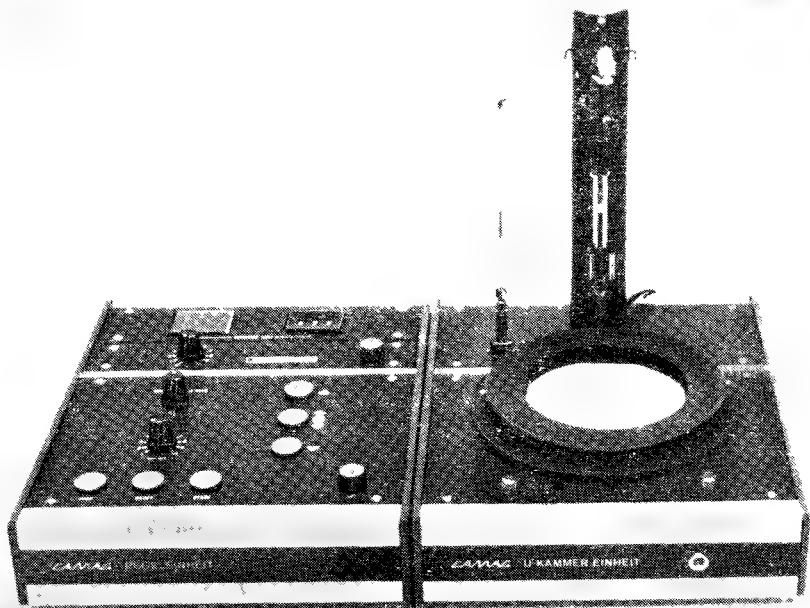


Рис. 155. Прибор «CAMAG U-Chamber system»

степенно расплывается круглое пятно. Оно достигает стартового круга, и с этого момента начинается элюция. Фракции из отдельных пятен располагаются по радиусу, принимая форму коротких дуг; фракции из препарата, нанесенного в виде кольца, — форму концентрических колец.

Радиальная ТСХ имеет следующие особенности и достоинства.

1. Радиальная скорость тока элюента убывает по мере удаления от центра пластинки. Это означает, что медленно мигрирующие компоненты смеси (с малыми R_F) элюируются с большей скоростью, чем уходящие вперед «быстрые» компоненты. Такая ситуация может быть выгодна для хорошего разрешения на одной пластинке смеси веществ, сильно различающихся по хроматографической подвижности.

2. Непрерывное замедление скорости элюции в направлении от центра к периферии приводит также к сужению хроматографических зон, поскольку задний фронт каждой зоны движется немного быстрее переднего. Это явление противодействует диффузии в радиальном направлении и улучшает разрешение.

3. Общую скорость элюции можно регулировать — она определяется не капиллярными явлениями на переднем фронте элюента (хотя эти явления и остаются физической причиной его продвижения), а скоростью подачи жидкости в центр пластинки — разумеется, если эта скорость меньше максимальной, которую может обусловить процесс смачивания сорбента.

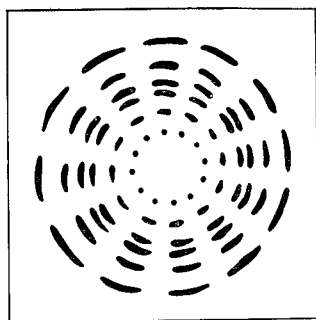
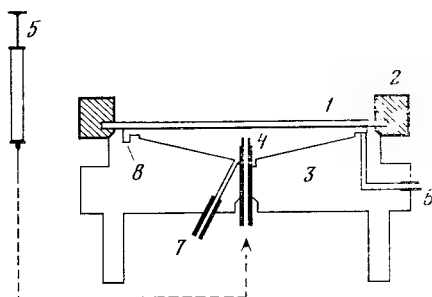


Рис. 156. Разрез через U-образную камеру прибора (см. текст)

Рис. 157. Расположение пятен на пластинке после проведения радиальной хроматографии идентичных препаратов

4. Радиальная ТСХ позволяет имитировать (с целью выбора хроматографической системы) процесс жидкостной колоночной хроматографии (ЖКХ). По центральному капилляру на пустую пластинку подают небольшую порцию элюента, так что близ центра пластинки образуется область равновесия неподвижной и подвижной жидких фаз. Потом в тот же капилляр с помощью специального шприца вручную впрыскивают препарат и продолжают подачу элюента из основного шприца (5). Препарат сорбируется в центре пластинки в тех же условиях, как при ЖКХ, а затем элюируется оттуда равномерно по всем направлениям, так что хроматографические фракции (после окраски) имеют вид концентрических колец.

В описываемом приборе можно осуществлять и радиальную ТСХ любым объемом элюента (превосходящим объем жидкости, необходимой для смачивания пластинки). С этой целью на пластинку сверху устанавливают специальный кольцевой нагреватель. Элюент на периферии пластинки испаряется, и его пары удаляются прокачкой сухого газа от периферической кольцевой канавки к центру камеры.

Имеется вариант простого прибора для «антирадиальной ТСХ» («CAMAG Anticircular U-chamber»). Здесь препарат или серию препаратов в виде пятен наносят по кругу на периферию пластинки. Еще дальше от центра по концентрической щели (подобно тому как было описано для прибора «CAMAG HPTLC linear developing chamber»; см. рис. 154) из кольцевой камеры на пластинку поступает элюент. Миграция элюента и фракционирование идут по направлению от периферии к центру. Фронт элюции представляет собой кольцо, уменьшающееся в диаметре. Разрешение фракций от этого страдает, но зато осуществляется концентрирование материала в них, что позволяет использовать сильно разбавленные исходные препараты.

Стремясь отразить современный прогресс техники ТСХ, мы представили ряд усовершенствованных приборов, которые наряду

со многими достоинствами обладают одним общим недостатком — они довольно дороги. Экспериментатор должен трезво оценить, насколько оправданы расходы на их приобретение и в каких случаях можно вполне обойтись обычной микропипеткой для нанесения препарата и прямоугольной банкой для проявления пластинок. Кстати, с помощью очень простого устройства можно осуществлять и радиальную ТСХ. Для этого (рис. 158) достаточно иметь пластинку с отверстием в середине, уложить ее слоем сорбента

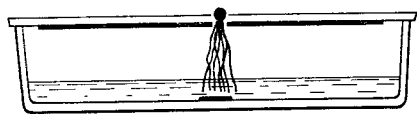


Рис. 158. Простейшее устройство для радиальной хроматографии

вниз на чашку с элюентом, а через центральное отверстие пластинки пропустить фитиль из ваты.

Осуществление двумерной хроматографии не вносит каких-либо дополнительных технических проблем. Препарат наносят в виде пятна в угол пластинки, на расстоянии около 1,5 см от каждого из краев. Не следует располагать его ближе к краю во избежание краевых эффектов при проявлении в первом направлении, которое должно дать цепочку одинаково удаленных от бокового края пластинки пятен. После полного высушивания при комнатной температуре пластинку снова устанавливают в банку или прибор для элюции, повернув на 90° , так что цепочка пятен первого разделения оказывается на старте второго. Элюент, разумеется, заменяют, а пластинку, если это необходимо, уравнивают в его паре, как описано выше.

Фракционирование в каждом из направлений обычно заканчивают по достижении фронтом края пластинки. Иногда увеличивают объем элюции путем удлинения пластинки фитилем или с помощью испарения элюента с конца пластинки. Наконец, в каждом направлении можно использовать повторную элюцию после промежуточного высушивания.

ОБНАРУЖЕНИЕ ПЯТЕН ИЛИ ПОЛОС

Окрашивание

В пятнах и полосах разделенных веществ после опрыскивания пластинки специальной смесью реагентов идут химические реакции, приводящие к развитию окраски, что позволяет не только визуально обнаруживать пятна, но и оценивать содержание в них веществ спектрофотометрически — по интенсивности поглощения света определенной длины волны. Современные сканирующие денситометры (с монохроматором или набором фильтров) работают в отраженном свете, что позволяет исключить поглощение в стеклянной подложке и денситометрировать пятна на пластинках с непрозрачной подложкой. Поскольку свет отражается только от поверх-

ности пятна, а интенсивность окрашивания зависит не только от количества вещества, но и от толщины слоя сорбента, то количественную оценку содержания в пятнах известных веществ приходится вести с помощью внесенных в этот же слой «стандартов» — определенных количеств того же вещества.

Пятна и полосы сканируют построчным продвижением пластинки мимо выходной щели источника света. Длину пути сканирования, расстояние между строками и скорость движения пластинки можно регулировать. Результаты сканирования выводятся на аналоговый регистратор, числовой интегратор или компьютер. Денситометр «CAMAG TLC/HPTLC Scanner» комплектуется специальным столиком для сканирования радиальных хроматограмм — сканирование ведется по радиусам с поворотом пластинки после каждого прохода на заранее выбранный угол.

Из большого числа реагентов для окрашивания хроматограмм [Mikeš, 1979] назовем только два наиболее пригодных для окраски компонентов белков и НК. Нингидриновый реактив уже встречался нам при описании аминокислотных анализаторов. В ТСХ его употребляют для той же цели — окраски аминокислот и пептидов. Для опрыскивания используют 0,2%-ный раствор нингидрина в этаноле, ацетоне, смеси абсолютного этанола и ледяной уксусной кислоты (4 : 1) или смеси бутанола и 10%-ного водного раствора уксусной кислоты (19 : 1). В последнем случае для развития темнофиолетовой окраски пластинку прогревают при 105° в течение 20 мин. Керн и соавторы рекомендуют для окраски пептидов трипсинового гидролизата использовать раствор, содержащий 0,03 % нингидрина, 3 % коллидина (триметилпиридина) и 10 % CH_3COOH в этаноле [Kern et al., 1979]. Недавно было предложено опрыскивать пластинки смесью 1%-ного раствора нингидрина в ацетоне и 1%-ного раствора хлорида стронция в 20%-ной CH_3COOH (1 : 6). Окраска развивается быстро и сохраняется в течение нескольких недель [Abbasí et al., 1980].

Для окраски фосфорных эфиров в компонентах НК была предложена следующая пропись. 1 г молибдата аммония растворяют в 90 мл метанола, под тягой (образуется нитрометан) медленно добавляют 10 мл 70%-ного раствора HNO_3 , энергично перемешивают до полного растворения молибдата, вносят по 1 г аскорбиновой и антрахиловой кислот и перемешивают до получения прозрачного желтого раствора, которым и опрыскивают промытые метанолом пластинки. Реагент стоек в течение нескольких часов. При высыхании пластинки при комнатной температуре фосфорные эфиры проявляются в виде устойчивых синих пятен на желтом фоне [Bochner et al., 1981].

Флюоресцентные красители

Для детектирования пептидов на современном уровне чувствительности нингидриновый реактив непригоден; ему на смену пришли флюоресцентные красители. Например, пластинку опрыскивали 0,01%-ным раствором флюоресцамина в ацетоне, высушивали, кла-

ли рабочим слоем вниз на источник длинноволнового УФ-света и через фильтр, отсекающий ультрафиолетовое излучение, фотографировали. 5 мкг исходного триптического гидролизата белка при двумерном фракционировании давали более 70 хорошо регистрируемых пятен [O'Kane et al., 1978]. При аналогичной обработке Лэй рекомендовал более тщательную процедуру: промыть пластинку ацетоном, высушить, опрыскать 1 %-ным раствором триэтиламина в ацетоне, снова высушить, лишь потом опрыскать раствором флюоресцамина в ацетоне, еще раз промыть ацетоном, а затем уже регистрировать флюоресценцию [Lai, 1977]. Кстати, обе приведенные методики не позволяют выявить пептиды, оканчивающиеся пролином. Для их обнаружения пластинку следует прогреть в течение 3 ч при 110°, после чего можно зарегистрировать флюоресценцию и этих пептидов. Следует иметь в виду, что флюоресценция остальных пептидов при этом исчезнет, — контуры их пятен следует обвести до прогревания.

Флюоресценцию без опрыскивания можно наблюдать после ТСХ данзильрованных производных аминокислот и пептидов при освещении пластинок длинноволновым УФ-светом. Интенсивность желтой флюоресценции данзильных производных увеличивается в щелочной среде; для этого пластинки опрыскивают 1 %-ным раствором триэтилоламина в изопропанолe и высушивают.

Для количественной оценки интенсивности флюоресценции используют сканирующие флюориметры. Названный выше прибор фирмы «САМАГ» может работать и в режиме измерения интенсивности флюоресценции, используя в качестве источника возбуждающего света ртутную лампу высокого давления.

Опрыскивание пластинок любым из проявляющих растворов следует вести в вытяжном шкафу на фоне листа фильтровальной бумаги или в специальном коробе, присоединенном к вытяжке. Такие коробки выпускаются фирмами «САМАГ» и «Desaga», как и прочие вспомогательные устройства: УФ-лампы длинно- и коротковолнового диапазонов, устройства для фотографирования пластинок в видимом и УФ-свете («САМАГ Reprostar», «Desaga UVIS»), пульверизаторы и др.

Детектирование веществ по УФ-поглощению

К числу таких веществ относятся нуклеиновые основания, нуклеотиды и олигонуклеотиды, а также фенилтиогидантоиновые производные аминокислот (ФТГ-АК). Удобно наблюдать не само поглощение, а ослабление флюоресценции добавленного в сорбент флюорогена в местах расположения пятен вещества, происходящее в результате поглощения ими коротковолнового УФ-света, которым освещают пластинку. При визуальном наблюдении или на фотографии в лучах видимого света вещества обнаруживаются в виде темных пятен на светлом флюоресцирующем фоне. Метод позволяет обнаруживать до 0,5 мкг олигонуклеотидов в пятне и широко исполь-

зуется для локализации пятен и полос после ТСХ, однако количественную оценку с его помощью произвести трудно. Для этой цели носитель из области пятна соскребают (из пластинки с пластиковой подложкой — вырезают), вещество элюируют и его количество определяют по оптической плотности элюата.

Точнее и значительно чувствительнее радиоактивные методы детектирования (ауторадиография, флюорография) и количественной оценки содержания вещества в пятнах путем просчета элюатов, порошков и целых пятен — как перенесенных в жидкий сцинтиллятор, так и на самой пластинке — с помощью счетчиков радиоактивности. Эти методы, в том числе и для ТСХ, были подробно описаны в предыдущей книге этой серии [Остерман, 1983]. Дополним это описание только ссылкой на недавно опубликованное предложение заменить ППО в качестве сцинтиллятора для флюорографии на метилантранилат — прекрасный сцинтиллятор, представляющий собой вязкую жидкость, которую удобно наносить на пластинку. При -80° метилантранилат затвердевает, что дает возможность вести флюорографическую регистрацию контактным способом [Boschper, Ames, 1983]. Стоит также упомянуть оригинальное устройство для отсасывания порошка сорбента с ТСХ-пластинки и количественного переноса его в сцинтиллятор [Platt, 1978].

Для идентификации пятен часто используют сопоставление со «свидетелями» — заведомо известными веществами. Их удобно наносить в отдельные пятна на старте пластинки по обе стороны от ряда пятен исследуемых смесей веществ. Определение значений R_F для той же цели ведут обычно на фотографиях или ауторадиограммах пластинок. Если нет уверенности, что точка или линия старта получатся на этих фотографиях, то надо позаботиться об их отметке.

ЭЛЮЦИЯ ВЕЩЕСТВА С ПЛАСТИНКИ

Для извлечения вещества из какой-либо фракции после ТСХ с целью дальнейшего анализа или использования выскребают и отсасывают порошок сорбента из соответствующего пятна или вырезают само пятно и элюируют материал в малом объеме растворителя. Для пятен, вырезанных из пластиковых пластинок, объем элюента можно свести к минимуму, воспользовавшись хроматографической элюцией (рис. 159). Один конец пластмассовой полоски, на которой находится пятно вещества, срезают углом, а к противоположному концу скрепкой прикрепляют полоску фильтровальной бумаги. Последнюю закладывают между двумя предметными стеклами и погружают в чашечку с элюентом так, чтобы отогнутый вниз выступающий из стекл конец полоски с пятном направлял скапывающий с вершины угла элюат в микропробирку.

Фирма «САМАГ» автоматизировала этот процесс в приборе «САМАГ Eluchrom». Вокруг пятен на пластинке специальным устройством выскребаются кольца, по которым уплотняются элюирующие головки с плоским круглым дном. На один конец диаметра круга с заданной малой скоростью подается элюент, а с другого

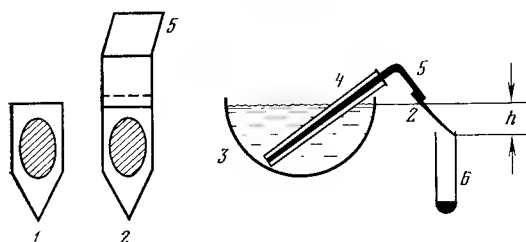


Рис. 159. Хроматографическая элюция материала из пятна

- 1 — участок пластиковой пластинки с пятном;
- 2 — прикрепление фитиля (5) из фильтровальной бумаги;
- 3 — резервуар с элюентом;
- 4 — предметные стекла;
- 6 — пробирка

конца он через гибкий капилляр собирается в микропробирку. Элюцию можно вести водным буфером, соевым раствором или разбавленной кислотой — в зависимости от характера растворимости вещества, находящегося в пятне.

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТСХ И ТСЭ

【ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

ТСХ аминокислот и их производных (ФТГ-АК, ДНФ-АК, данзил-АК) посвящен подробный, хотя и несколько устаревший, обзор [Niederwieser, 1972], где в основном описаны варианты фракционирования на пластинках, покрытых силикагелем и целлюлозой.

ТСХ модифицированных ароматическими заместителями аминокислот в последние годы предпочитают вести на пластинках с полиамидным покрытием, поэтому из обзора Нидервизера процитируем только методы фракционирования немодифицированных аминокислот. Разумеется, ни по чувствительности и воспроизводимости результатов, ни тем более по точности количественных определений ТСХ аминокислот не может конкурировать с современными аминокислотными анализаторами. Однако существует немало ситуаций, когда возможности ТСХ оказываются вполне адекватными поставленной задаче: определение аминокислотного состава, сопоставление родственных полипептидов, выявление генетических различий, проявляющихся в замене каких-либо аминокислот, клинические анализы физиологических жидкостей и др. На рис. 160 показана приведенная в цитируемом обзоре картина распределения пятен после двумерной ТСХ модельной смеси аминокислот на пластинках с силикагелевым покрытием. На старт вносили по 1 мкг каждой из аминокислот в 0,5 мкл 0,1 М раствора HCl. Элюцию в первом направлении проводили смесью хлороформа, метанола и 17%-ного аммиака (2 : 2 : 1), а во втором — смесью фенола и воды (3 : 1 по массе).

С целью имитации ситуации, имеющей место при гидролизе белков 6 н. HCl при 110°, когда производят защиту серусодержащих аминокислот от неконтролируемого окисления, вместо цистеина и метионина на рис. 160 фигурируют цистеинсульфокислота и метионинсульфон — продукты окисления цистеина и метионина надмуравьиной кислотой; по этой же причине отсутствуют аспарагин и глютамин

(см. гл. 7). На рис. 161 для сопоставления представлена двумерная хроматограмма смеси аминокислот на пластинке, покрытой целлюлозой (из того же обзора). В обеих картинах распределения пятен можно усмотреть одну общую закономерность: гидрофобные аминокислоты располагаются в обоих направлениях дальше от старта, чем гидрофильные. Это — естественный результат использования нормально-фазового варианта хроматографии. Вместе с тем при более внимательном сопоставлении легко заметить существенные отличия в расположении пятен отдельных аминокислот. Этот факт является следствием более тонких различий в растворимости отдельных аминокислот в подобранных системах растворителей. Заштрихованная в нижней части хроматограммы полоска обозначает слой катионообменной смолы «Amberlite CG-120» (H^+), смешанной с целлюлозой в пропорции 3 : 0,45. Остальная часть пластинки покрыта целлюлозой MN 300. Назначение слоя катионита — удаление соли из препарата до начала хроматографического разделения. Пластинку с нанесенным на ионообменник препаратом проявляли (в первом направлении) и высушивали; Na^+ задерживался на смоле, а HCl вымывалась из пластинки.

Детектирование пятен осуществляли опрыскиванием 0,5%-ным раствором нингидрина в смеси ледяной уксусной кислоты и бутанола (1 : 20) с последующим прогреванием пластинок (30 мин при 80° или 10 мин при 110°).

Удобный прием для сопоставления контрольной и исследуемой смесей аминокислот (в данном случае для анализа мочи) был предложен Мессрипуром и соавторами. Обе смеси наносили в противоположных концах стартовой линии одной пластинки и разделяли в первом направлении одновременно. Затем во втором направлении вели элюцию с двух противоположных краев пластинки поочередно, навстречу друг другу, до средней линии (рис. 162). Сопоставление как бы зеркально отраженных картин значительно удобнее для идентификации пятен, чем сравнение двух отдельных пластинок. Кроме того, оно и надежнее, поскольку оба разделения проводятся на одной и той же пластинке. Авторы использовали обычные пластинки размером 20×20 см, покрытые слоем микрокристаллической целлюлозы толщиной 0,2 мм. Для элюции в первом направлении применяли систему изопропанол— $HCOOH$ — H_2O (69 : 15,5 : 15,5), во втором — пиридин—ацетон—вода—аммиак (45 : 30 : 20 : 5) [Messripor et al., 1979]. Очевидно, что при подобном сопоставлении особенно удобны пластинки для ВЭТСХ и описанный выше прибор «SAMA G HPTLC linear developing chamber», в котором элюцию можно вести с двух краев пластинки одновременно.

При анализе содержания в физиологических жидкостях свободных аминокислот встает задача предварительной полной очистки их от белков. Для малых объемов плазмы (5—25 мкл) была описана элегантная методика осаждения белка холодным (-30°) ацетоном в капилляре ($100 \times 0,6$ мм) с последующим центрифугированием в нем же, после чего кончик капилляра с осадком белка просто обламывали [Arola et al., 1977].

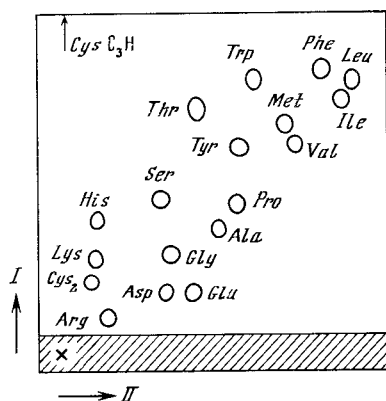
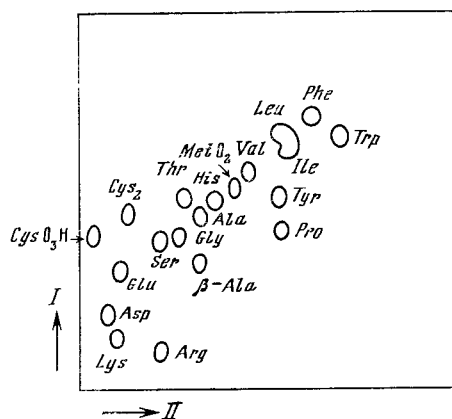


Рис. 160. Двумерная хроматография модельной смеси аминокислот на пластинке с силикагелевым покрытием [Niederwieser, 1972]

Рис. 161. То же, что на рис. 155, но на пластинке, покрытой целлюлозой MN 300

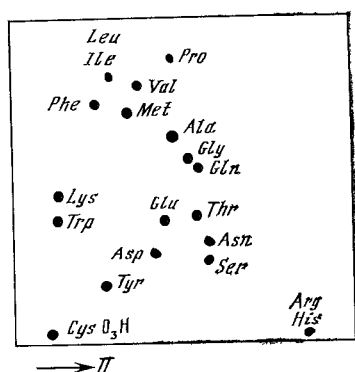
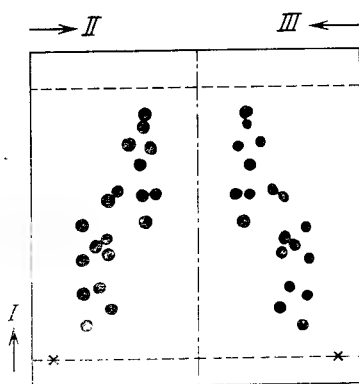


Рис. 162. Совместная двумерная ТСХ в целях сопоставления исследуемой и контрольной смеси аминокислот [Messripour et al., 1979]

Рис. 163. Фракционирование ФТГ-аминокислот на полиамидной пластинке 5 × 5 см [Summers et al., 1973]

ФТГ-АК Саммерс и соавторы фракционировали в субнаномольных количествах на полиамидных пластинках размером 5 × 5 см [Summers et al., 1973]. Смесь растворенных в метаноле ФТГ-АК наносили для двумерной ТСХ в виде пятна диаметром менее 2 мм. Проявление в первом направлении вели смесью толуол—пентан—ледяная CH_3COOH (12 : 6 : 7) с добавлением сцинтиллятора «butyl PBD» в концентрации 0,025%. Пластику предварительно уравнивали в парах этой смеси. За 10 мин фронт элюента доходил до верхнего края пластинки. Ее сушили горячим воздухом и во втором направлении вели элюцию 35%-ной CH_3COOH . Под УФ-освещением фон

пластинки (благодаря присутствию сцинтиллятора) интенсивно флюоресцировал, а ФТГ-АК можно было обнаружить в виде темных пятен, расположение которых показано на рис. 163. По данным авторов, удавалось обнаруживать пятна, содержавшие 0,05 нмоль аминокислоты.

Используя аналогичную систему ТСХ для идентификации ФТГ-АК в последовательных циклах секвенирования полипептидов по методу Эдмана (вручную), Рид и Мак-Кэй столкнулись со следующей трудностью: на месте ФТГ-Arg в каждом цикле выходил некий, также гасящий флюоресценцию фона побочный продукт реакции. Они описали метод детектирования истинного пятна ФТГ-Arg путем дополнительной обработки пластинки смесью (1 : 1) 0,02%-ного раствора фенантрехинона и 10%-ного раствора NaOH в 60%-ном этаноле. После такой обработки только пятна ФТГ-АК при освещении длинноволновым УФ-светом давали интенсивную желто-зеленую флюоресценцию на слегка флюоресцирующем голубоватом фоне пластинки [Reed, Mac Kay, 1978].

Методика Саммерса и соавторов недавно была успешно использована и в другой работе [Ryoji, Kaji, 1982]; единственное отличие — в выборе сцинтиллятора (0,1% ВВОТ). Описана также эффективная и быстрая система одномерного разделения всех двадцати ФТГ-АК на силикагелевых пластинках для ВЭТСХ. Элюцию вели последовательно пятью различными растворителями. Благодаря одномерности имеется возможность анализировать до 18 препаратов одновременно, что дает выигрыш по времени анализа даже по сравнению с ЖХВД [Schuette, Pole, 1982].

Макниколь подробно описал варианты ТСХ данзилированных производных аминокислот на полиамидных пластинках [Macnicol, 1978]. Для малополярных данзил-АК он рекомендует следующую систему проявления: в первом направлении — 1,5%-ный раствор HCOOH, во втором — двукратно смесь бензол — CH₃COOH (9 : 1), а затем — смесь бутилацетат—метанол—CH₃COOH (30 : 20 : 1). Полярные данзил-АК лучше разделяются, если в первом направлении использовать 0,5%-ный раствор HCOOH, а во втором — смесь хлороформ — метилэтилкетон—CH₃COOH (8 : 1 : 1).

Упомянем также об обнаружении фосфорилированных под действием киназ аминокислот после кислотного гидролиза белков. В этом случае наиболее удобным оказался двумерный высоковольтный электрофорез на бумаге («Whatman 3ММ») при pH 3,5 и 1,9 [Clinton et al., 1982].

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ

Пластинки, покрытые слоем целлюлозы

В текущей литературе очень часто встречаются описания двумерного разделения пептидов (например, триптических гидролизатов белка) на пластинках микрогранулированной целлюлозы, где в первом направлении проводится электрофорез в кислой среде, а во

втором — распределительная нормальнофазовая ТСХ. Для того чтобы проиллюстрировать тот факт, что условия этих разделений стабилизировались, а также иметь случай познакомиться с конструкцией простых лабораторных приборов для такого электрофореза, рассмотрим два примера.

В 1977 г. было опубликовано подробное описание такого фракционирования [Сгасу, 1977]. Прежде всего проводили подготовку и ферментативный гидролиз белка. Подготовка состояла в карбоксиметилировании остатков цистеина во избежание образования побочных S—S-связей между пептидами в результате их окисления в ходе эксперимента.

100 мкг белка вносили в реакционный флакон объемом 1 мл с коническим дном и соответствующей формы магнитиком («Readi-Vial» фирмы «Pierce») и там высушивали в токе азота, а затем растворяли в 0,2 мл буфера для модификации (0,5 М Трис-HCl, pH 8,5 + 0,25 М ЭДТА + 6 М гуанидинхлорид — 8 мМ β-меркаптоэтанол). Сосуд закрывали резиновой пробкой, через нее с помощью иглы замещали воздух в сосуде на сухой азот и в этой атмосфере перемешивали в течение часа при комнатной температуре. За это время происходили денатурация и восстановление белка. Таким же путем вносили 10 мкл свежеприготовленного раствора подкисленной кислоты (29 мг в 10 мл воды) и вели карбоксиметилирование остатков цистеина в течение 20 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл β-меркаптоэтанола. После этого раствор освобождали от нелетучих солей диализом против 0,2 М NH_4HCO_3 лиофилизировали и суспендировали в 0,2 мл того же раствора. ТРСК-трипсин добавляли двумя порциями, по 0,5 мкг (из водного раствора с концентрацией 100 мкг/мл) с интервалом в 3 ч. Общее время гидролиза белка — 6 ч при 37°. Полученный таким образом трипсиновый гидролизат лиофилизировали все в том же флаконе.

Перед началом электрофореза содержимое флакона смывали со стенок в 50 мкл 2%-ного раствора NH_4OH , смыв центрифугированием собирали на его коническом дне, подсушивали азотом и вновь растворяли в 10 мкл того же раствора NH_4OH . Отсюда 1—5 мкл (0,2—1 нмоль белка с $M \approx 50\,000$) с помощью калиброванного капилляра наносили вблизи угла пластинки, покрытой слоем микрогранулированной целлюлозы толщиной 0,25 мм («Polygram CEL 400»), не ближе 3 см от одного из ее краев (того, который будет находиться в контакте с анодом) и подсушивали.

Схема сконструированного автором простейшего приборчика для электрофореза на ТСХ-пластинке показана на рис. 164.

Пластинку опрыскивали до надежного увлажнения (но без избытка жидкости на ее поверхности) буфером для электрофореза, в качестве которого использовали смесь пиридин—ледяная CH_3COOH —вода (1 : 10 : 89), pH 3,7. При этом пятно препарата закрывали кружком бумаги диаметром 1 см, так что увлажнение целлюлозы на старте происходило постепенно — за счет капиллярного эффекта. Две смоченные таким образом пластинки рабочим слоем вниз укладывали рядом на торцы пропитанных тем же буфером губок-фитилей, расположенных в буферных отсеках прямоугольной камеры прибора, и накрывали стеклом. Электроды были расположены под губками. Затем в камеру поверх электродных буферов, под пластинки и над ними заливали охлажденную жидкость типа бензина («Varsol»). Электрофорез при напряжении 300 В и силе тока 20 мА занимал 2—3 ч на холоду. После окончания электрофореза пластинку сушили не менее часа на воздухе при комнатной температуре, а затем помещали в прямоугольный хроматографический сосуд ($22 \times 21 \times 10$ см) для восходящей хроматографии во втором (перпендикулярном к первому) направлении. Объем внутри сосуда предварительно уравнивали в течение 30 мин парами элюента для хроматографии, в качестве которого использовали смесь бутанол—пиридин—ледяная CH_3COOH —вода (50 : 33 : 1 : 40). На дно закрытого крышкой

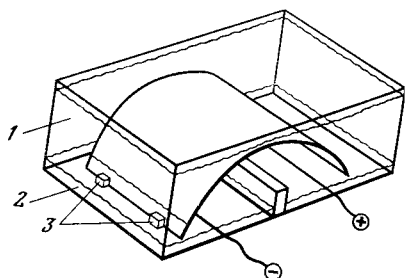
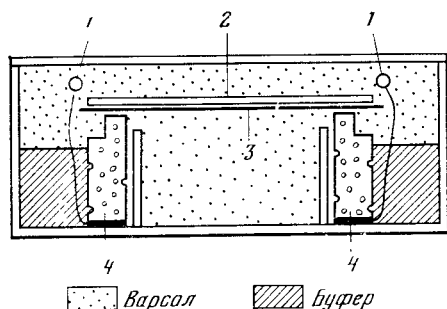


Рис. 164. Схема простого прибора для проведения электрофореза на стеклянной ТСХ-пластинке [Сгасу, 1977]

1 — электроды; 2 — толстая стеклянная пластина (груз); 3 — пластинка для ТСХ; 4 — фильтры из губчатой пластмассы

Рис. 165. Прибор для проведения электрофореза на ТСХ-пластинке с пластиковой подложкой [Whittaker, Moss, 1981]

1 — варсол; 2 — электродный буфер; 3 — упоры

сосуда наливали 50 мл этой смеси, а стенки выстилали смоченной в элюенте фильтровальной бумагой. Хроматографию вели также в течение 2—3 ч до момента подъема фронта элюента к уровню, отстоящему на 2 см от верхнего края пластинки. Затем ее высушивали на воздухе, опрыскивали сначала 10%-ным раствором триэтиламина в метилхлориде, потом после кратковременной сушки — 0,1%-ным раствором флюоресцамина в ацетоне и снова раствором триэтиламина. Флюоресцирующие пятна пептидов наблюдали и очерчивали при освещении длинноволновым УФ-светом (360 нм).

Если форма пятен оказывается не круглой, то это указывает на неполную отмывку солей из препарата. Флюоресценция фона пластинки или переднего фронта элюента указывает на необходимость дополнительной очистки растворителей и промывки пластинки элюентом. Флюоресценция на старте может наблюдаться в связи с неполным перевариванием белка.

Флюоресцамин при опрыскивании реагирует не более чем с 10% общего количества каждого пептида, поэтому материал из каждого пятна соскребали, переносили в пастеровскую пипетку с пробкой из стеклянной ваты, откуда пептид элюировали тремя порциями (по 0,2 мл) 6 н. HCl с добавлением 0,02% β-меркаптоэтанол. Элюат отфильтровывали от следов целлюлозы на мембранном фильтре и подвергали кислотному гидролизу для анализа аминокислотного состава пептида.

Мы довольно подробно рассмотрели эту работу с тем, чтобы более не возвращаться к техническим подробностям, а отмечать лишь некоторые отличия в постановке аналогичных экспериментов другими авторами.

Авторы следующей работы [Whittaker, Moss, 1981] сконструировали еще более простой прибор для электрофореза (рис. 165). В нем нет ни губок, ни прижимающего стекла. Пластинка «Polygram CEL-300», упираясь в четыре выступа, изгибается так, что ее края оказываются погруженными в электродные буферы, а вся она находится в варсоло. Буфер для электрофореза здесь точно такой же,

как у Крэси, а для элюента восходящей хроматографии была выбрана несколько иная пропорция компонентов: бутанол—пиридин—ледяная CH_3COOH —вода (15 : 100 : 3 : 100). Главное отличие здесь — в заметном снижении содержания бутанола. Быть может, это связано с тем обстоятельством, что авторы использовали пластинку волокнистой, а не микрокристаллической целлюлозы. Электрофорез вели при напряжении 900 В в течение 35 мин (условия охлаждения пластинки были лучше благодаря отсутствию прижимного стекла).

Интересна модификация процедуры фракционирования, которая, по утверждению авторов, заметно улучшает форму пятен. Сначала они промывали пластинку в течение ночи восходящей хроматографией, потом сушили и наносили препарат. Затем в том же направлении, что и промывку пластинки, вели хроматографию на расстояние 5 см (считая по фронту элюента). После этого пластинку подсушивали и проводили электрофорез в перпендикулярном направлении, а затем — снова хроматографию в первом направлении, теперь уже до конца. По мнению авторов, важно строго придерживаться оптимального режима сушки пластинки после электрофореза (в их опытах — 20 мин при 50°, а затем 10 мин при комнатной температуре). Указывается, что если выдержка в комнатных условиях недостаточна, то пятна при хроматографии плохо мигрируют, а если избыточна — расплываются. Трактовка этих наблюдений не предложена. Возможно, что здесь играла роль степень увлажнения сорбента за счет влаги воздуха.

В некоторых недавних работах электрофорез вели при pH 4,4 или 4,7 [Kern et al., 1979; Schmitt et al., 1980; Ajro et al., 1981; Bonne et al., 1982]. В буфер для электрофореза, помимо пиридина, CH_3COOH и воды, вводили ацетон или бутанол. Объектами исследования служили белки, связанные с нуклеиновыми кислотами. Впрочем, в качестве варианта в последней из перечисленных работ предлагается электрофорез в смеси CH_3COOH — HCOOH —вода (3 : 1 : 16) при pH 4,6. Во втором направлении всюду использовали хроматографию в смеси бутанол—пиридин— CH_3COOH —вода (15 : 10 : 3 : 12).

Возможен и обратный порядок разделения — сначала хроматография, потом электрофорез в таких же, как описано выше, условиях [Ernst et al., 1980; Saheki et al., 1982].

Пластинки, покрытые слоем силикагеля

В этом случае применяют похожие варианты фракционирования. Например, Планк и соавторы [Planck et al., 1980] в первом направлении использовали электрофорез в сильноокислой среде точно такой же, как в одном из вариантов уже упоминавшейся работы [Bonne et al., 1982], т. е. в смеси CH_3COOH — HCOOH —вода (3 : 1 : 16), а во втором — восходящую хроматографию в очень близком по составу элюенте: бутанол—пиридин— CH_3COOH —вода (32,5 :

25 : 5 : 20). Электрофорез вели при напряжении 1000 В в течение 80 мин при 2°, а хроматографию — в течение 5 ч после предварительного уравнивания пластинки в парах элюента в течение 12 ч при комнатной температуре.

Иногда применяют другую систему хроматографии (в первом направлении) — элюцию ведут смесью хлороформ—метанол—конц. NH_4OH (2 : 2 : 1). Во втором направлении используется электрофорез в кислой среде, например в смеси пиридин— CH_3COOH —вода (1 : 10 : 489), pH 3,5, или в почти нейтральной — та же смесь, но в пропорции 100 : 3 : 897 (pH 6,5). В последнем варианте суммарный заряд различных пептидов может быть как положительным, так и отрицательным, поэтому для хроматографии в первом направлении гидролизат белка наносят не в угол, а посередине нижнего края пластинки, чтобы в процессе электрофореза пептиды мигрировали в обе стороны от ее средней линии [Stephens, 1978; Fishbein et al., 1980]. Во второй из этих работ, где ТСХ пептидов (трипсинового гидролизата щелочной дегидрогеназы из дрожифилы) вели на наномолярном уровне, интересно отметить подбор растворителя для элюции пептидов из порошка силикагеля, который выскребали из пятен. Оказалось, что для этой цели лучше всего подходят растворители основного характера: N-этилморфолин—пропанол—вода (4 : 1 : 5) или конц. NH_4OH —пропанол—вода в той же пропорции. Порошок, перенесенный в пипетку с пробкой из стекловолокнистого фильтра, смачивали 0,25 мл такой смеси, выдерживали в течение 15 мин, а потом элюат выдавливали азотом.

Теперь следует упомянуть работу, где двумерной хроматографией на полиамидных пластинках фракционировали данзилированные пептиды. Данзилирование диофилизированных пептидов трипсинового гидролизата гемоглобина осуществляли в смеси равных объемов (по 20 мкл) раствора гидролизата в 0,2 М Na-бикарбонатном буфере (pH 9,8) и 0,1%-ного раствора данзилхлорида в ацетоне. В запаянной ампуле смесь инкубировали при 37° в темноте в течение 30 мин, затем сушили в вакууме и растворяли в 50 мкл абсолютного этанола. На микропластинки размером 5×5 см по 1 мкл этого раствора вносили под бинокулярной лупой, так что диаметр пятна не превышал 0,5 мм. В первом направлении хроматографию в течение 12 мин вели в 5%-ном водном растворе HCOOH , во втором — в смеси бензол— CH_3COOH (3 : 1) в течение 25 мин. Детектирование пятен — по флюоресценции при освещении УФ-светом [Tichu, 1975].

Что касается детектирования пептидов флюоресцентными методами, то несомненный интерес представляет недавнее предложение использовать для этой цели хорошо знакомый по методу регистрации радиоактивности сцинтиллятор ППО (2,5-дифенилоксазол). В цитируемой работе при ТСХ пептидов во втором направлении на пластинках, покрытых целлюлозой «Whatman CC-41», в уже знакомом нам элюенте (бутанол—пиридин— CH_3COOH —вода в пропорции 15 : 10 : 3 : 12) растворяли ППО до концентрации 5 г/л. При освещении высушенной пластинки коротковолновым УФ-све-

том (254 нм) пептиды выглядели как темные окрашенные пятна на ярко-голубом флюоресцирующем фоне. Окраска пептидов варьирует от темно-пурпурной или красно-коричневой до золотистой или темно-зеленой. Было показано, что присутствие сцинтиллятора не сказывается на хроматографической подвижности пептидов, не мешает их элюции, аминокислотному анализу и секвенированию. Кроме того, пятна пептидов можно дополнительно окрашивать и нингидрином [Hopp, Woods, 1979].

С помощью флюоресценции можно на «пептидной карте» выделить пятна пептидов, содержащих цистеин. Для этой цели Клазен [Klasen, 1982] воспользовался недавно разработанным флюоресцентным красителем, специфичным к SH-группе, с торговым названием «DASM» (N-(7-диметиламино-4-метилкумаринил)малеинимид). Свободный краситель не флюоресцирует, а после присоединения по тиоловой группе дает стабильный флюоресцирующий продукт (λ_{max} возбуждения — 383 нм, λ_{max} флюоресценции — 480 нм) с квантовым выходом около 45% [Yamamoto et al., 1977]. Двумерное хроматографическое фракционирование трипсинового гидролизата белка Клазен вел методами высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге «Whatman 3MM». По окончании фракционирования лист бумаги обмакивали в 0,01 мМ раствор DASM в смеси ацетона и пиридин-ацетатного буфера, pH 6,4 (9 : 1), подсушивали и наблюдали в длинноволновом УФ-свете. Флюоресцируют только пятна пептидов, содержащих цистеин [Klasen, 1982].

В заключение отметим вариант «двумерного» фракционирования пептидов комбинацией колоночной (в данном случае — ионообменной) хроматографии и ТСХ фракций с колонки на пластинках силикагеля [Aromatorio et al., 1980]. Это — частный пример из широкой области использования ТСХ как дополнительного инструмента для анализа результатов фракционирования пептидов различными рассмотренными ранее методами колоночной хроматографии, в том числе и ЖХВД.

Распределительная ТСХ целых белков встречается редко ввиду обычно прочной сорбции гидрофильных белков на целлюлозе или силикагеле и плохой их растворимости в органических элюентах. Однако для липофильных белков этот метод может быть с успехом использован [Audubert, Semmel, 1979]. Липофильные белки из культуры клеток зародыша цыпленка (экстрагированные смесью хлороформа с метанолом) авторы успешно фракционировали двумерной ТСХ на пластинках силикагеля, используя для элюции в первом направлении смесь хлороформ—метанол—вода (65 : 25 : 4), а во втором — смесь *n*-бутанол—CH₃COOH—вода (3 : 1 : 1).

Ионообменная ТСХ гидрофильных белков вполне возможна, но ее практически оттеснил более совершенный метод электрофореза в полиакриламидном геле и пленках ацетилцеллюлозы (последний метод нашел себе применение для клинических анализов физиологических жидкостей).

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ

Нуклеотиды хорошо растворимы в воде. Остаток фосфорной кислоты вплоть до очень кислых значений pH сохраняет отрицательный заряд, а при щелочных pH может нести и два таких заряда. Вместе с тем нуклеиновые основания в кислой среде протонируются, причем неодинаково (подробно этот вопрос рассматривался в гл. 7). Напомним, что в растворах умеренной ионной силы для протонирования цитозина (по N_3) $pK = 4,5$, протонированию N_1 аденина отвечает $pK = 4,1$, а гуанин протонируется по N_7 заметно труднее ($pK = 3,2$). Урацил и тимин в кислой среде остаются незаряженными. Все это дает возможность путем выбора pH элюента создавать различие суммарных зарядов нуклеотидов, которое удобно использовать в ионообменной ТСХ.

Волькерт и Фиерс предложили быстрый микрометод определения нуклеотидного состава РНК посредством ТСХ на пластинках РЕИ-целлюлозы. После исчерпывающего гидролиза меченных ^{32}P олигорибонуклеотидов или РНК T_1 - и T_2 -РНКазой до 3'-нуклеотидов они наносили пятна гидролизатов на линию старта вдоль длинной стороны пластинки РЕИ-целлюлозы размером $10 \times 6,5$ см (такие пластинки нарезают из продажных «Polygram CEL-300») и вели одномерную двухступенчатую элюцию. Сначала элюировали 0,5%-ным раствором $HCOOH$, потом пластинку высушивали и элюировали повторно в том же направлении 0,15 М водным раствором $HCOOLi$ (pH 3). Оба процесса элюции занимали по 10 мин; за это время фронт элюента доходил до верхнего края пластинки. Пятна мононуклеотидов обнаруживали по гашению флюоресценции целлюлозы при УФ-освещении и автордиографически. В 0,5%-ной $HCOOH$ положительные заряды цитозина и аденина достаточно велики, чтобы заметно мешать соответствующим нуклеотидам задерживаться на полиэтиленимине. Они мигрируют в направлении элюции, причем UMP обгоняет AMP благодаря большому среднему положительному заряду (из-за цитозина). UMP и GMP остаются при этом практически еще на старте. Далее следует ионообменная хроматография: ионы формиата вытесняют из связи с анионообменником все четыре нуклеотида, а ионы Li^+ нейтрализуют заряды фосфатов. Для GMP этому процессу способствует еще и некоторый положительный заряд, благодаря чему он «уходит вперед» от UMP . Загрузка пятен на старте, по рекомендации авторов, не должна превышать 20 мкг РНК (носителя). Чувствительность при визуальном детектировании под УФ-светом — около 0,5 мкг нуклеотида в пятне, при автордиографии — до 5 расп./мин по каждому нуклеотиду при трехнедельной экспозиции [Volckaert, Fiers, 1977a].

Одномерной ионообменной ТСХ на полосках РЕИ-целлюлозы размером $1,2 \times 6,5$ см удобно отделять $sAMP$ от AMP , например при исследовании активности $sAMP$ -фосфодиэстеразы [Rangel-Aldao et al., 1978]. Элюцию можно вести 0,05—0,12 М водным раствором KCl (концентрацию следует подобрать для данной партии РЕИ-целлюлозы) в нейтральном буфере. Благодаря циклизации фосфата отрицательный заряд $sAMP$ меньше, чем AMP , и циклофосфат уходит

вперед. В типичном эксперименте были найдены следующие значения R_F : 0,12 для AMP, 0,32 для cAMP и 0,5 для аденозина; 0,06 для GMP, 0,26 для cGMP и 0,52 для гуанозина. Разделение занимало 7—8 мин. Пятна выявляли под УФ-освещением, вырезали и для количественных оценок просчитывали радиоактивность (субстратом фосфодиэстеразы служил меченый цикломонофосфат).

Для анализа нуклеотидного состава ДНК, включая минорный метилированный нуклеотид $m^5\text{Cp}$, была использована двумерная ТСХ на стандартных пластинках PEI-целлюлозы [Reddy et al., 1981]. Смесью микрококковой нуклеазы и фосфодиэстеразы селезенки исследуемую ДНК (1 мкг) полностью гидролизovali до 3'-моонуклеотидов. Затем для последующей локализации пятен и количественных определений моонуклеотиды метили ^{32}P путем фосфорилирования по 5'-положению рибозы с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$. Таким образом, разделению подлежали нуклеозиддифосфаты вида pNp . 2 мкг инкубационной смеси (после обработки ее апиразой для перевода ^{32}P из избытка радиоактивно меченного АТР в неорганический фосфат) наносили в угол пластинки PEI-целлюлозы (20×20 см), которую предварительно вымачивали в течение 30 мин в 0,1 М HCOONH_4 (рН 3,5), а затем сушили. Эта операция представляла собой перевод ионообменника в формиатную форму. Элюцию в первом направлении вели сначала 0,8 М HCOONH_4 (рН 3,5) не менее 15 ч до ухода фронта элюента еще на 25 см по фитилю из бумаги «Whatman N1», пришитому к верхнему краю пластинки. Затем без промежуточного высушивания (на фитиле остается еще не смоченный участок) продолжали элюцию, сменив элюент на 4 М HCOONH_4 при том же рН. Механизм разделения здесь также основан на различии зарядов оснований, но хроматографический процесс протекает намного медленнее, чем в предыдущем примере, поскольку фракционируются дифосфаты.

После окончания разделения в первом направлении пластинку высушивали, вымачивали в метаноле, снова подсушивали и начинали элюцию во втором направлении (тоже с удлинительным фитилем). Элюцию начинали водой до старта, а затем 0,3 М водным раствором сульфата аммония вплоть до продвижения фронта элюента на 4—5 см по фитилю. Пятна локализовали автордиографией, затем вырезали и просчитывали радиоактивность методом регистрации черенковского излучения [Остерман, 1983]. На рис. 166 представлено окончательное расположение хроматографических пятен. Несколько неожиданным является сильно сдвинутое вправо положение пятна $p\text{Tp}$. По-видимому, 0,3 М сульфат аммония легко вытесняет все нуклеозиддифосфаты из ионной связи с PEI, и решающую роль в определении скорости миграции начинает играть сорбция оснований на целлюлозе. Метильная группа тимина препятствует сорбции. В пользу такой трактовки говорит и соотношение положений пятен $p\text{Cp}$ и $m^5\text{Cp}$. $p\text{Tp}$ обгоняет $m^5\text{Cp}$ вероятно, по той причине, что $p\text{Tp}$ уже движется вслед за фронтом элюции во втором направлении, когда этот фронт еще только достигает пятна $m^5\text{Cp}$ и начинается растворение находящегося в нем материала.

Сходная методика была использована теми же авторами при выяснении точек повреждения ДНК мутагенами и канцерогенами, химически модифицирующими нуклеиновые основания [Randerath et al., 1981]. В этой работе был применен любопытный прием удаления с пластинки радиоактивного неорганического фосфата, который, как видно из рис. 166, мигрирует быстрее нуклеозиддифосфатов и может радиоактивно «пачкать» пластинку. В инкубационную смесь одновременно с апиразой добавляли вольфрамат натрия, связывающий ^{32}P . Элюцию в первом направлении начинали раствором 4 М HCOOLi (рН 4), содержащим 7,5 М мочевины, до уровня 5 см над линией старта. Такое энергичное воздействие сдвигало все нуклеозиддифосфаты, в то время как комплекс, содержащий ^{32}P , практически еще оставался на старте. Его отрезали, пластинку промывали в метаноле и высушивали, а затем уже начинали элюцию формиатом аммония примерно по такой же схеме, как было описано выше, но с меньшими концентрациями, поскольку заряды фосфатов были частично уже нейтрализованы литием.

Недавно Бохнер и Эймс отработали систему двумерной ТСХ на РЕИ-целлюлозе, позволяющую успешно разделять одновременно рибон- и дезоксирибонуклеотиды, их ди- и трифосфаты, а также НАД и его производные. Чувствительность метода столь высока, что на пластинку достаточно было нанести кислый экстракт из миллиона меченных ^{32}P бактериальных клеток (рис. 167). Элюцию в первом направлении вели 0,75 М Tris-HCl (рН 8), во втором — кислым раствором сульфата и бисульфата аммония следующего состава: 74 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0,4 \text{ г } (\text{NH}_4)\text{HSO}_4 + 4\text{ г } \text{Na}_2\text{-ЭДТА} + 100 \text{ мл } \text{H}_2\text{O}$. В этой же работе предложена двумерная система фракционирования на РЕИ-целлюлозе нуклеозид-5'-монофосфатов, включая минорные нуклеотиды [Bochner, Ames, 1982].

Для фракционирования 5'-монорибонуклеотидов, включая многие, встречающиеся в тРНК минорные нуклеотиды, удобно (ввиду метилирования миноров) воспользоваться двумерной распределительной хроматографией [Silberklang et al., 1979]. Полученные исчерпывающим гидролизом 3'-нуклеозидфосфаты сначала, как и выше, метили в 5'-положении радиоактивным фосфором за счет $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ АТР}$ с помощью Т4-полинуклеотидкиназы, а затем фосфор из 3'-положения удаляли действием 3'-фосфатазы. ТСХ вели на стеклянных пластинках, покрытых слоем целлюлозы толщиной 0,1 мм. Смесь $[5'\text{-}^{32}\text{P}]$ монорибонуклеотидов наносили в угол пластинки в объеме 0,5—2 мкл. При хроматографии в первом направлении на верхний край пластинки с помощью пластмассовой скрепки прикрепляли фитиль из бумаги «Whatman 3ММ». Элюцию вели смесью изомасляная кислота — конц. NH_4OH — вода (66 : 1 : 33) в течение 12 ч при 20°. Пластинки сушили сутки при комнатной температуре и элюировали во втором направлении смесью 0,1 М Na -фосфатного буфера (рН 6,8), сухого сульфата аммония и *n*-пропанола (100 : : 60 : 2; объем/масса/объем) до расстояния 1—2 см от верхнего края пластинки. Ее сушили при 65°, маркировали радиоактивными чернилами и проводили автордиографию. На рис. 168 показано рас-

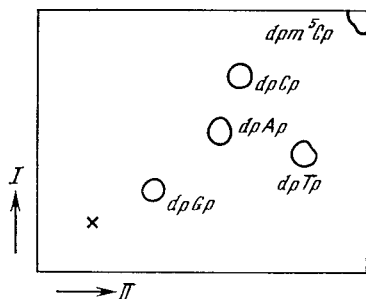
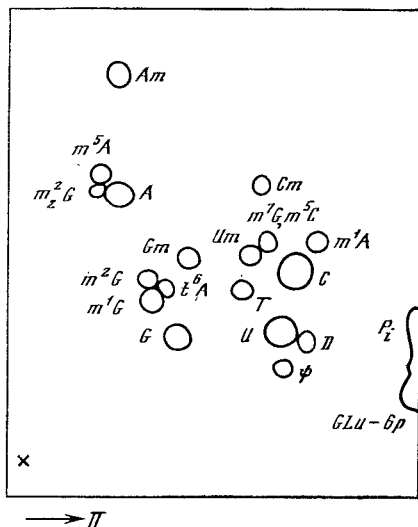
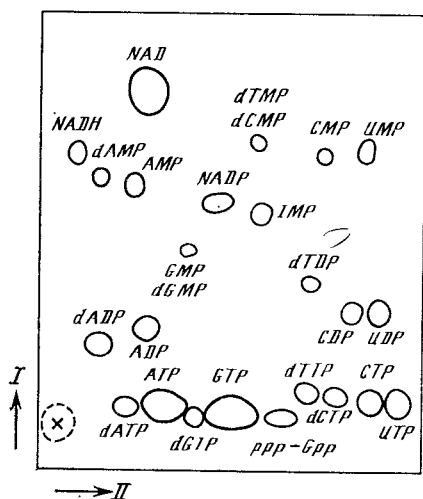


Рис. 166. Анализ нуклеотидного состава ДНК двумерной ТСХ на пластинке РЕИ-целлюлозы [Reddy et al., 1981]

Рис. 167. Двумерная ТСХ на РЕИ-целлюлозе смеси рибо- и дезоксирибонуклеозидмоно-, ди- и трифосфатов, а также НАД и его производных [Boschne, Ames, 1982]

Рис. 168. Фракционирование минорных 5'-рибонуклеотидов двумерной ТСХ на целлюлозе [Silberklang et al., 1979]



положение пятен наиболее часто встречающихся минорных и четырех обычных нуклеотидов. Количественные оценки и сопоставления пятен по радиоактивности делать нельзя, так как Т4-полинуклеотидкиназа не в одинаковой степени фосфорилирует разные минорные нуклеотиды.

Фракционирование рибонуклеозидов при помощи распределительной ТСХ до недавнего времени играло роль главного метода анализа нуклеотидного состава РНК (особенно тРНК), включая идентификацию модифицированных по нуклеиновым основаниям, но не метилированных по рибозе минорных нуклеозидов. Своей популярностью, как и ограничением в отношении метилирования рибозы, метод был обязан разработанной Рандератом и соавторами методике введения радиоактивной метки (^3H) в остаток рибозы посредством ее перподатного окисления и восстановления за счет меченого NaBH_4 [Остерман, 1983]. Использовались, например, следующие хроматографические системы для пластинок целлюлозы (20×20 см): в первом направлении — *n*-бутанол—изопропанол—7,5 М NH_4OH (3 : 3 : 2), во втором — *трет*-амиловый спирт—ме-

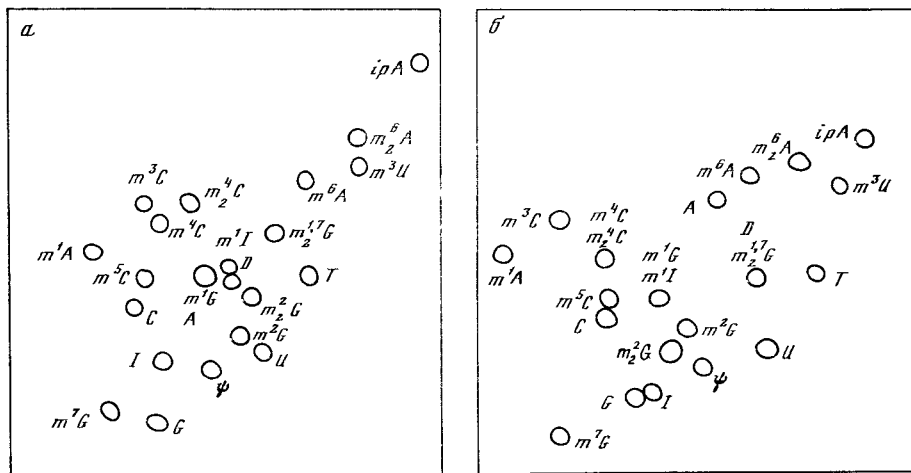


Рис. 169. Фракционирование смеси обычных и минорных рибонуклеозидов двумерной ТСХ в тонком слое целлюлозы (а) и силикагеля (б) [К. Randerath, E. Randerath, 1971]

тилэтилкетон—вода—НСООН (2 : 2 : 1 : 0,4; дважды). Для силикагелевых пластинок того же размера в первом направлении использовали систему *n*-бутанол—изопропанол—7,5 М NH₄ОН (4 : 3 : 1) во втором—*n*-бутанол—метилэтилкетон—вода—НСООН (6 : 6 : 1 : 0,3). Схематически результаты фракционирования смеси минорных и обычных нуклеозидов показаны на рис. 169. Пятна регистрировали флюорографией после смачивания пластинки 7%-ным раствором ППО в эфире [К. Randerath, E. Randerath, 1971]. Позднее [Randerath et al., 1974] была дана улучшенная рецептура элюентов для ТСХ нуклеозидов на волокнистой целлюлозе типа MN300, которой авторы отдают предпочтение перед микрокристаллической. Сейчас этот метод уступил место цитированному выше методу ТСХ [5-³²P]-рибонуклеотидов как в силу значительного выигрыша в чувствительности при замене трития на ³²P, так и благодаря возможности регистрировать метилированные по рибозе миноры.

Упомянем также работу, где фракционирование большого числа минорных нуклеозидов с помощью распределительной ТСХ на целлюлозе осуществляли вообще без использования радиоактивных изотопов, проводя визуальное детектирование пятен под УФ-светом. Правда, при этом авторам приходилось наносить на пластинку (в пятне диаметром 1,5 см) 2—3 оптические единицы, т. е. около 0,1 мг гидролизата тРНК, а в качестве пластинки использовать лист покрытой целлюлозой алюминиевой фольги размером 20 × 50 см, зато приведенная ими картина разделения нуклеозидов содержит около 40 пятен. Количественную оценку (для расшифровки структуры тРНК) проводили по УФ-поглощению элюатов из пятен [Rogg et al., 1976].

Описано фракционирование нуклеиновых оснований, в том числе и минорных, двумерной ТСХ на пластинках со смешанным сорбентом (целлюлоза—силикагель) [Munnis et al., 1973]. В первом направлении элюцию вели смесью этилацетат—метанол—вода—88%-ная HCOOH (100 : 25 : 20 : 1), во втором — ацетонитрил—этилацетат—изопропанол—бутанол—вода—30%-ный NH₄OH (40 : 30 : 20 : 10 : 5 : 22).

Нуклеиновые основания и нуклеозиды можно разделять ТСХ на целлюлозе, используя в качестве элюентов водно-солевые растворы [Bij, Lederer, 1983]. Основную роль в этих случаях играют гидрофобные взаимодействия нуклеиновых оснований с целлюлозой и эффект высаливания.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Фракционирование олигонуклеотидов в тонком слое играет центральную роль в некоторых методах секвенирования нуклеиновых кислот, особенно тРНК, где из-за высокого уровня содержания модифицированных нуклеотидов методы секвенирования с использованием электрофореза в ПААГ наталкиваются на серьезные трудности.

Начиная с работ Сэнджера и сотрудников конца 60-х годов и до настоящего времени широкой популярностью пользуются методы двумерного фракционирования олигонуклеотидов, в которых разделение в первом направлении осуществляется высоковольтным электрофорезом на полоске ацетилцеллюлозы. Достоинства этого материала (крупные и гомогенные по размерам поры в тонком однородном слое носителя) были отмечены выше, а сравнительно малая емкость для современных методов анализа с применением радиоактивных изотопов не является серьезным ограничением. Во втором направлении использовали также электрофорез, но на анионообменной бумаге «Whatman DE-81» [Sanger, Brownlee, 1967].

С тех пор метод эволюционировал; особенно плодотворным оказалось введение теми же авторами для разделения во втором направлении хроматографии на пластинках ДЭАЭ-целлюлозы с элюцией так называемой «гомосмесью» («гомохроматография»). Такой вариант двумерного фракционирования олигонуклеотидов подробно описан в статье Баррелла, основные положения которой (для сопоставления с последующими модификациями) имеет смысл теперь рассмотреть [Barrell, 1971].

Гидролиз примерно 20 мкг ³²P-РНК рибонуклеазами T1 или A (1 мкг) вели в капилляре, в объеме 3—5 мкл; на старт полоски ацетилцеллюлозы наносили всю инкубационную смесь. Электрофорез вели в кислом водно-органическом буфере (рН 3,5), содержащем 0,5% пиридина, 5% CH₃COOH и 7,5 М мочевины. Полоску размером 3 × 55 см предварительно замачивали — клали на открытую поверхность буфера, давая возможность жидкости постепенно впитываться в материал полоски с нижней ее поверхности; так удавалось избежать задержания в сетке ацетилцеллюлозы микропузырьков воздуха. Затем один конец полоски подсушивали и наносили препарат на старт, в 10 см от конца. По обеим сторонам от препарата наносили маркерные красители (метилоранж, фуксин и ксиленила-

пол). Электрофорез вели в высоком цилиндре, на его дно заливали слой буфера, в котором располагался анод. Катодный буфер (того же состава) и сам катод помещались во внутреннем резервуаре, закрепленном в верхней части цилиндра. Полоска ацетилцеллюлозы своими концами погружалась в оба буфера (рис. 170). Весь объем цилиндра заполняли уайтспиритом или варсолом. Так обеспечивали теплоотвод в процессе электрофореза, который проводили при высокой напряженности поля (50—100 В/см), чему соответствовало общее напряжение 2—4 кВ.

Препарат располагали со стороны катода, а миграция шла сверху вниз, к аноду, поскольку суммарный отрицательный заряд фосфатов доминировал для любого из олигонуклеотидов. Вместе с тем при pH 3,5 заметный вклад давали и положительные заряды оснований, особенно цитозина и аденина; таким образом, фракционирование шло по заряду, точнее, по величине отношения суммарного заряда олигонуклеотида к его массе, а следовательно, по нуклеотидному составу. Электрофорез вели до момента достижения желтым маркером анода. Большинство олигонуклеотидов располагалось между красным и синим маркерами.

Пластинку ДЭАЭ-целлюлозы готовили самп, смешивая ионообменную целлюлозу «MN 300 DEAE» с обычной волокнистой целлюлозой типа MN 300 в пропорции 1 : 7,5 (а для крупных олигонуклеотидов — 1 : 10). Без такого разбавления элюция олигонуклеотидов с пластинки продажной ДЭАЭ-целлюлозы была бы затруднительной.

1 и 7,5 г соответствующих порошков целлюлозы гомогенизировали с 50 мл воды в блендере в течение 5 мин, затем нагревали до 100° на 2 мин и деаэрировали. С помощью приспособления «TLC-spreader» на стеклянной пластинке размером 20 × 40 см формировали слой сорбента толщиной 0,25 мм. Перенос материала с ацетилцеллюлозы на старт пластинки осуществляли следующим образом. Под контролем портативного счетчика радиоактивности из ацетилцеллюлозы вырезали участок длиной 20 см и клали его на пластинку параллельно ее краю на расстоянии 3 см от конца. Сверху накладывали три слоя влажной фильтровальной бумаги «Whatman 3MM» и прижимали ее стеклом. В течение 15 мин на пластинку из ацетилцеллюлозы переходило до 75 % материала.

На рис. 171 изображен способ переноса, предложенный позже Саузерном. Он не требует пояснений, кроме того, что фильтровальную бумагу время от времени дополнительно смачивают водой. Благодаря использованию круглой палочки препарат переносится на старт пластинки в виде узкой полоски, что улучшает разрешение при последующей хроматографии [Southern, 1974].

Вариант элюции с ионообменника, который было предложено использовать для фракционирования олигонуклеотидов, точнее, называть не ионообменной, а «вытеснительной» хроматографией. Со стороны старта на пластинку ДЭАЭ-целлюлозы поступает раствор немеченных олигонуклеотидов не вполне определенного состава, но заведомо более крупных, чем фракционируемые радиоактивно меченные олигонуклеотиды. Обладая очень большим сродством к анионообменнику, немеченные олигонуклеотиды постепенно вытесняют из связи с ним радиоактивные олигонуклеотиды, заставляя их мигрировать вместе с растворителем. Сами же немеченные олигонуклеотиды остаются прочно связанными с обменником (пластинка используется однократно). Естественно, что в первую очередь со старта вытесняются наиболее короткие олигонуклеотиды, затем более длинные.

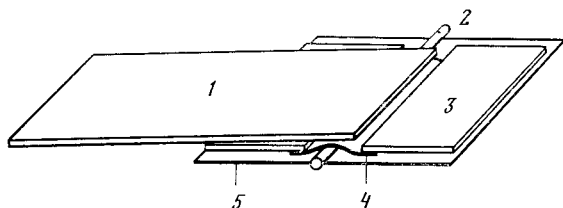
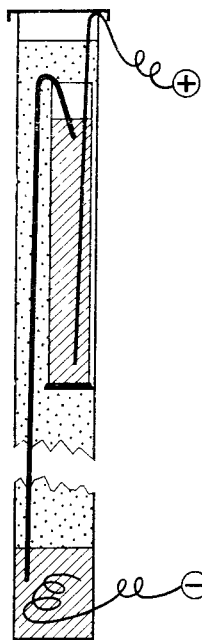


Рис. 171. Способ переноса материала с полоски ацетилцеллюлозы на старт стеклянной пластинки для ТСХ [Southern, 1974]

- 1 — пластинка (рабочим слоем вниз);
- 2 — стеклянная палочка;
- 3 — прижимающие стекла;
- 4 — полоска ацетилцеллюлозы;
- 5 — смоченная водой фильтровальная бумага

Рис. 170. Устройство для осуществления высоковольтного электрофореза гидролизата РНК на полоске ацетилцеллюлозы [Barrell, 1971]

Последние таким же образом вытесняют короткие олигонуклеотиды, которые снова успели сорбироваться в непосредственной близости от стартовой полосы. Затем их самих опять вытесняют продолжающие поступать с элюентом крупные немеченые олигонуклеотиды и т. д. В результате происходит фракционирование олигонуклеотидов по длине: впереди идут наиболее короткие из них, а далее — все более длинные. В зависимости от длины фракционируемых олигонуклеотидов в качестве «гомосмеси» немеченых олигонуклеотидов используют либо просто 5%-ный раствор продажной суммарной дрожжевой РНК, нейтрализованный КОН, в который добавляют до 7 М мочевины (гомосмеси «А» и «В»; вторая отличается от первой удалением солей диализом против воды перед добавлением мочевины), либо продукты неполного щелочного гидролиза такой РНК (в 1 н. КОН в течение 15 мин при комнатной температуре), которые затем нейтрализуют HCl и диализуют против воды, а затем добавляют мочевины (гомосмесь «С»).

Восходящую хроматографию с элюцией гомосмесью вели, как обычно, в хроматографической камере, внутренний объем которой уравнивали парами гомосмеси при 60°. До этой же температуры предварительно подогревали пластинку с перенесенным на нее препаратом; хроматографию вели также при температуре 50—60° (в печи). Фронт элюента достигал верхнего края пластины за 5—8 ч. Олигонуклеотиды локализовали с помощью автордиографии, целлюлозу из пятен выскребали, мочевины отмывали этанолом, а олигонуклеотиды элюировали 30%-ным раствором триэтиламонийкарбоната (pH 10).

Волькерт и соавторы в ходе расшифровки первичной структуры РНК фага MS2 использовали тот же метод с небольшими модификациями. Так, для гомохроматографии они пользовались продажными

пластинками фирмы «Macherey and Nagel» типов «Polygram CEL300 DEAE/HR-2/15» (для фракционирования Т1-РНКазных гидролизатов) и «Polygram CEL 300 PEI» (для панкреатических гидролизатов). Как ясно из наименований, это пластинки на пластмассовой подложке. Не встречавшееся ранее обозначение «2.15» указывает на то, что пластинка покрыта смесью ДЭАЭ-целлюлозы и обычной целлюлозы в пропорции 2:15 (специально для гомохроматографии). В то время выпускались пластинки размером 20×20 см, и авторы вынуждены были удлинять их, пришивая фитили из фильтровальной бумаги (кончик фитиля выступал из банки); сейчас же выпускаются пластинки размером 20×40 см. Несколько отличался и состав гомосмеси: 30 г дрожжевой РНК (фирмы «BDH») гидролизовали в 100 мл 0,75 М КОН в течение 1 ч при 37° , а затем, минуя диализ, разбавляли водой до 1 л, растворяли мочевины (до 7 М) и нейтрализовали HCl до pH 7,5. Таким образом, в их гомосмеси, помимо продуктов частичного гидролиза РНК, присутствовал и 0,075 М KCl. Несколько отличался по своему составу и буфер для электрофореза: концентрацию мочевины в нем уменьшили до 5 М и ввели 2 мМ ЭДТА [Volckaert et al., 1976].

В рассмотренных ниже работах Зильберкланга и соавторов по секвенированию тРНК с использованием описываемого способа двумерного фракционирования олигонуклеотидов, а также в совсем недавних работах других авторов [Goldenberg et al., 1980] добавка 2 мМ ЭДТА в буфер для электрофореза закрепились, но концентрация мочевины сохраняется на уровне 7 М. В работе, посвященной описанию аналогичного метода секвенирования коротких фрагментов ДНК, есть указание на то, что электрофорез дезоксирибоолигонуклеотидов на ацетилцеллюлозе лучше проводить при более кислом значении pH — 2,8 вместо 3,5. Хотя различие положительных зарядов нуклеиновых оснований при этом должно уменьшаться, разделение на уровне олигонуклеотидов выигрывает [Tu, Wu., 1980]. Таким образом, методика гомохроматографии, описанная Барреллом еще в 1971 г., без существенных изменений сохранила свое значение до самого последнего времени.

Вместе с тем делались (и достаточно успешно) попытки отказаться от гомохроматографии во втором направлении, заменив ее обычной ионообменной. Так, даже в итоговой публикации Зилберкланга и соавторов, посвященной методу секвенирования тРНК, наряду с гомохроматографией рассматривается вариант разделения олигонуклеотидов во втором направлении ионообменной хроматографией на пластинках PEI-целлюлозы с элюцией 2 М пиридин-форматным буфером (pH 3,4) [Silberklang et al., 1979].

Домди и Гросс предложили вести элюцию олигонуклеотидов на пластинках «Polygram CEL 300/HR-2/15» линейным градиентом концентрации (0,25—0,35 М) формиата аммония (pH 5,5) в присутствии 9 М мочевины и 1 мМ ЭДТА. На дно камеры, куда устанавливались две пластинки размером 20×40 см с фитилями длиной 10 см, наливали 120 мл 0,25 М HCOO NH_4 , а затем через отверстие близ дна с помощью перистальтического насоса по каплям в течение

10 ч подавали 0,45 М HCOONH_4 , так что конечная концентрация формата аммония достигала 0,35 М. Хроматографию вели при 65°, хотя авторы указывают на то, что ее можно вести и при комнатной температуре, удвоив время элюции. Сопоставляя свой метод с гомохроматографией, они отмечают, что на 1 см² поверхности пластинки сорбируется до 1 мг нерадиоактивных олигонуклеотидов гомосмеси, что приводит к некоторому размазыванию радиоактивных пятен. Но главное преимущество их метода, разумеется, заключается в том, что вообще нет необходимости вводить радиоактивную метку и пятна олигонуклеотидов получаются чистыми, без «носителя». Путем обычного фотографирования пятен при освещении УФ-светом была получена очень хорошая картина двумерного фракционирования гидролизата 5S РНК из 250 мкг исходного препарата [Domdey, Gross, 1979].

К описанным модификациям метода двумерного фракционирования олигонуклеотидов, ведущего свое происхождение от метода Сэнджера, мы снова вернемся в конце раздела при сопоставлении методов секвенирования тРНК, а сейчас остановимся на совершенно другом варианте двумерного фракционирования олигонуклеотидов — с помощью ТСХ в обоих направлениях, т. е. без использования электрофора.

Одновременно с рассмотренным выше методом разделения 3'-рибонуклеотидов одномерной ионообменной ТСХ на пластинках РЕ1-целлюлозы размером 10 × 6,5 см Волькерт и Фиерс описали и метод двумерного фракционирования олигонуклеотидов ионообменной ТСХ на этих же пластинках. Авторы разделяли олигонуклеотиды вида $(\text{Ar})_n\text{Cp}$, $(\text{Ar})_n\text{Up}$ и $(\text{Ar})_n\text{Gp}$. Набор таких олигонуклеотидов получается при переваривании РНК (совместно или в любой последовательности) РНКазой Т1 из такадиастазы и панкреатической РНКазой А. В первом направлении (на длину 6,5 см) элюцию вели 22%-ным водным раствором HCOOH . В столь кислой среде почти все остатки аденина заряжены положительно, поэтому при любом числе звеньев суммарный электрический заряд цепочки адениловых остатков $(\text{Ar})_n$ в первом приближении равен нулю. Тем более не вносит заряда и остаток цитидиловой кислоты. Таким образом, все олигонуклеотиды вида $(\text{Ar})_n\text{Cp}$, будучи не заряжены, не участвуют в ионном взаимодействии с РЕ1 и, следовательно, должны мигрировать вместе с фронтом элюента. На самом деле это не совсем так. Даже при очень кислых рН небольшая доля остатков аденина в каждый данный момент времени оказывается незаряженной (равновесие диссоциации), так что олигонуклеотиды вида $(\text{Ar})_n\text{Cp}$ будут в среднем заряжены слегка отрицательно, причем тем сильнее, чем больше число адениловых остатков в их цепи.

Все олигонуклеотиды вида $(\text{Ar})_n\text{Gp}$ должны мигрировать медленнее, чем соответствующие им (по длине) олигонуклеотиды предыдущего типа, так как остатки гуанина будут положительно заряжены далеко не полностью (напомним, что pK_a гуанина на 1,3 единицы рН меньше, чем цитозина). В силу отмеченного выше вклада остатков аденина можно ожидать перекрытия в первом направле-

нии: олигонуклеотиды вида $(Ap)_nGr$ при $n = 0, 1, \dots$ могут догнать или даже обогнать нуклеотиды вида $(Ap)_nCr$, у которых $n = 4, 5, \dots$. Эти рассуждения можно продолжить и для олигонуклеотидов вида $(Ap)_nUr$, которые будут мигрировать еще медленнее, поскольку остаток урацила заведомо не заряжен, так что каждое звено Ur вносит полноценный единичный отрицательный заряд в суммарный заряд олигонуклеотидов этого вида.

Практически элюцию в первом направлении вели следующим образом. Инкубационную смесь после ферментативного гидролиза до олигонуклеотидов наносили пятном в угол пластинки на расстоянии 1 см от каждой из сторон, элюировали водой до уровня фронта на 0,5 см выше пятна (этим вымывали из пятна посторонние

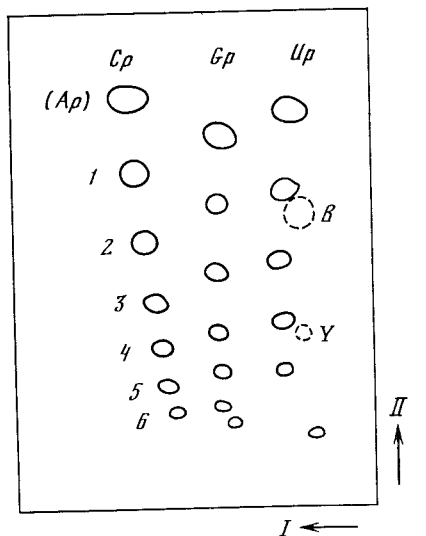


Рис. 172. Двумерное фракционирование олигонуклеотидов вида $(Ap)_nCr$, $(Ap)_nGr$ и $(Ap)_nUr$ на пластинке PEI-целлюлозы [Volckaert, Fiers, 1977b]

компоненты инкубационной смеси), затем край пластинки подсушивали и переносили ее в 22%-ную $HCOOH$. Элюция занимала 10 мин. Во втором направлении (на длину 10 см) элюцию начинали 0,1 М $HCOOH$, титрованной пиридином до pH 4,3. Когда фронт поднимался на 1 см выше линии расположения олигонуклеотидов, элюент в камере заменяли на 1 М $HCOOH$ -пиридин, pH 4,3. При таком значении pH менее половины остатков аденина в каждый данный момент времени несет положительный заряд ($pK_a = 4,1$), и, следовательно, скорость миграции олигонуклеотидов зависит главным образом от вклада отрицательного заряда цепочки вида $(Ap)_n$ — тем больше, чем больше звеньев (n) в этой цепочке (тем медленнее будет мигрировать олигонуклеотид). Из растянутых пятен олигонуклеотидов, образуя к концу элюции картину, показанную на рис. 172 [Volckaert, Fiers, 1977b].

В одной недавней публикации было отмечено, что чувствительность описанного метода (без использования радиоактивных изотопов) может быть увеличена в 30 раз, если окончательную картину фракционирования олигонуклеотидов рассматривать на пластинках PEI-целлюлозы с добавкой флюорогена; в пятне удастся обнаружить 0,5 мкг олигонуклеотидного материала. Однако 22%-ная $HCOOH$ растворяет и вымывает флюороген. Авторы предлагают вести разделение в первом направлении на пластинке PEI-целлюлозы без флюорогена, а затем переносить материал на пластинку с флюорогеном. Описано простое приспособление для такого переноса [Steinhäuser et al., 1982].

Общий обзор методов ТСХ олигонуклеотидов можно закончить кратким рассмотрением работы, где проводилась ионообменная ТСХ олигорибонуклеотидов на пластинках РЕИ-целлюлозы (25 × 20 см) ступенчатыми градиентами концентрации солей лития при температуре 60°.

Крупные олигонуклеотиды, полученные обработкой тРНК РНКазой S1 (разрыв по антикодону) или неполным гидролизом РНКазой T1, делили одномерной ТСХ. В одном из вариантов такой хроматографии элюцию проводили в слегка щелочном буфере (0,3 М Трис-НСl, pH 7,9 + 7,5 М мочевины) по следующей схеме: на 1 см выше старта — буфером без соли, на 6 см — 0,4 М LiCl, 14 см — 0,6 М, 19 см — 0,7 М и до 22 см — 0,8 М LiCl (все — в том же буфере). В другом варианте элюцию вели в кислой среде (pH 3,5) также с добавлением до 7,5 М мочевины ступенями 0—1—1,9—2,4—2,8 М HCOOLi. Высушенные пластинки отмывали от мочевины и соли сухим метанолом, пятна олигонуклеотидов регистрировали при УФ-освещении или с помощью флюорографии. Материал из вырезанных пятен можно было элюировать 2 М триэтиламонийкарбонатным буфером (pH 8,5).

Для дальнейшего анализа первичной структуры тРНК проводили исчерпывающий гидролиз крупных олигонуклеотидов прямо в пятнах на промытой после ТСХ пластинке, нанося на каждое пятно 25 единиц РНКазы T1 в 5 мкл 0,02 М Трис-НСl (pH 7,6) и выдерживая (прикрыв парафильмом) 6 ч при комнатной температуре. Эту операцию повторяли. Затем пятно вырезали и с помощью двух магнитиков (по обе стороны пластинки) прижимали в угол второй пластинки РЕИ-целлюлозы. Перенесенный на нее таким способом материал [Randerath et al., 1975] фракционировали двумерной ионообменной ТСХ, используя в одном направлении ступенчатую элюцию нарастающими концентрациями LiCl при pH 7,9, а в другом — ступенчатую элюцию HCOOLi при pH 3,5 (оба раза в присутствии 7,5 М мочевины), как было описано выше для двух вариантов одномерной элюции крупных олигонуклеотидов, но соответственно меньшими концентрациями солей. Пятна малых олигонуклеотидов локализовали под УФ-светом.

В другом варианте анализа исчерпывающий гидролиз РНКазой T1 вели в элюатах пятен крупных олигонуклеотидов. Затем их метили по методу Рандерата триптем и опять вели двумерную ионообменную ТСХ на пластинках РЕИ-целлюлозы с той разницей, что во втором направлении использовали ступенчатый градиент концентрации HCOONH₄. В этом варианте локализацию пятен осуществляли с помощью флюорографии [Chen, Roe, 1978].

СЕКВЕНИРОВАНИЕ тРНК

В настоящее время секвенирование тРНК в большинстве случаев осуществляют с помощью одного из двух рассмотренных ниже методов, включающих ТСЭ и ТСХ (выше отмечалось, что исполь-

зование для этой цели электрофореза в ПААГ затруднительно в связи с высоким содержанием минорных нуклеотидов).

Подробное описание первого метода дано в уже упомянутой работе [Silberklang et al., 1979]. Анализ структуры тРНК начинали с ферментативного гидролиза РНКазой T1 или панкреатической рибонуклеазой и введения метки ^{32}P на 5'-концы олигонуклеотидов с помощью T4-полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Затем проводили двумерное фракционирование олигонуклеотидов, как описано выше, с помощью электрофореза на ацетилцеллюлозе в первом направлении и гомохроматографии — во втором. Впрочем, использовали в качестве альтернативного и первоначальный вариант разделения во втором направлении, предложенный в свое время Сэнджером, а именно электрофорез на анионообменной бумаге «Whatman DE-81» в 7%-ной CH_3COOH или в смеси, содержащей 2,8% HCOOH и 8,7% CH_3COOH (рН 1,9). Способ приготовления гомосмесей несколько отличался от описанного Барреллом. Конечная концентрация продуктов гидролиза РНК в гомосмеси составляла 3%. Хроматографию вели на стеклянных пластинках размером 20×40 см, покрытых смесью целлюлоз «MN 300 HR» и «MN 300 DEAE» в пропорции 15 : 2 или тройной смесью «MN 300 HR» — «AVICEL» — «MN 300 DEAE» (10 : 5 : 2) при 65°. Локализованные автордиографией пятна олигонуклеотидов элюировали 2 М триэтиламмонийбикарбонатом (рН 7,5—8). На деталях этого этапа анализа останавливаться нет смысла — они мало чем отличаются от того, что описано выше.

Интерес представляет своеобразный метод определения последовательности нуклеотидов в элюированных после первого этапа сравнительно коротких (10—15 звеньев) олигонуклеотидах, получивший название «mobility shift analysis». Иногда его образно называют «методом блуждающего пятна» («wandering spot method»). Проводят неполный гидролиз каждого олигонуклеотида нуклеазой P1 в аликвотах в течение 2, 5, 10 и 20 мин. Эндонуклеаза P1 атакует олигонуклеотид в любом месте, разрывая фосфодиэфирную связь между 3'-ОН и 5'-фосфатом. Она способна полностью гидролизовать олигонуклеотид до 5'-монофосфатов, но условия и продолжительность гидролиза в аликвотах подбирают так, чтобы в результате получить набор всех возможных его фрагментов. При дальнейшем анализе аутордиографически обнаруживаются только фрагменты, несущие ^{32}P , введенный на 5'-конец целого олигонуклеотида. При соблюдении указанных условий гидролиза полный набор таких меченых фрагментов содержит цепочки с любым числом звеньев (n) — от $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{монофосфата}$ до целого $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{олигонуклеотида}$. Важно подчеркнуть, что фрагмент каждой длины представлен только одной последовательностью нуклеотидов, начинающейся с меченного ^{32}P 5'-концевого нуклеотида. Все вырезанные из середины или прилегающие к 3'-концу олигонуклеотида фрагменты оказываются немечеными. При этом каждый фрагмент длиной $n + 1$ звеньев, очевидно, содержит в себе целиком фрагмент из n звеньев, отличаясь от него только одним дополнительным нуклеотидом, находящимся в исходном олигонуклеотиде на $(n + 1)$ -м месте, считая от 5'-конца [Silberklang

et al., 1977]. Того же эффекта можно достичь, проводя частичный гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда — экзонуклеазой, ведущей отщепление 5'-монофосфатов с 3'-конца олигонуклеотида. Однако фосфодиэстераза змеиного яда иногда не может гидролизовать фосфодиэфирную связь рядом с некоторыми минорными нуклеотидами. Можно комбинировать действие обоих ферментов.

Такую смесь меченых фрагментов олигонуклеотида снова подвергают двумерному фракционированию электрофорезом на ацетилцеллюлозе и гомохроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе, как описано выше, а затем проводят автораддиографию. Однако теперь вместо разбросанных по всей пластинке пятен «фингерпринта» получается зигзагообразная цепочка следующих друг за другом пятен (рис. 173), анализ расположения которых дает информацию о последовательности нуклеотидов в олигонуклеотиде.

Поясним, на чем базируется этот анализ. Начнем со второго направления фракционирования — гомохроматографии. Из того, что было сказано раньше, следует, что удаление фрагментов от старта во втором направлении будет тем больше, чем короче фрагмент. Поскольку мы знаем, что на автордиограмме представлены фрагменты любой длины, отличающиеся друг от друга на один нуклеотид, мы можем заключить, что в верхнем пятне находится концевой [5'-³²P]моонуклеотид, и т. д. Поскольку на рис. 173 имеется 13 пятен, нижнее пятно соответствует исходному [5'-³²P]тридекануклеотиду. Пурины, как известно, дают более заметный вклад сорбции на целлюлозной матрице, чем пиримидины, поэтому укорочение на пиримидиновое звено приводит к меньшему сдвигу пятна укороченного фрагмента вверх, чем потеря 3'-концевого пурина.

Теперь обратимся к анализу результатов электрофореза в первом направлении. Нам следует отрешиться от привычного для электрофореза представления о торможении мигрирующего в электрическом поле вещества о сетку геля. Здесь мы имеем дело с относительно короткими олигонуклеотидами и крупнопористой матрицей ацетилцеллюлозы. Электрофоретическая подвижность определяется только отношением заряда к площади сечения молекулы вещества. С добавлением каждого нуклеотидного звена за счет остатка фосфорной кислоты суммарный заряд фрагмента увеличивается на —1. Пропорционально этому возрастает и масса фрагмента, но не его сечение, поскольку фрагмент представляет собой свободную цепочку, ориентированную в направлении электрофоретической миграции. В чистом виде такая картина характерна для присоединения остатка уридиловой кислоты, поскольку урацил заряда не несет. В этом случае удлиненный на одно звено фрагмент должен мигрировать в первом направлении заметно быстрее, чем предшествующий фрагмент. И это особенно сильно должно сказываться для очень коротких фрагментов, когда относительно большое увеличение заряда велико. Именно такую картину можно наблюдать на рис. 173 при переходе от левого верхнего пятна к следующему за ним, т. е. от концевой моонуклеотида к динуклеотиду. Далее увеличение подвижности при удлинении на один остаток уридиловой кислоты уменьшается. Качественно та-

кое же, но меньшее по величине изменение скорости миграции является результатом удлинения фрагмента на остаток гуаниловой кислоты. При pH 3,5 гуанин несет в среднем лишь небольшой положительный заряд, который не может компенсировать вклад отрицательного заряда фосфорной кислоты. Иное дело — в случае присоединения остатка цитидиловой кислоты. При pH 3,5 почти все остатки цитозина положительно заряжены ($pK = 4,5$). Это означает, что присоединение цитидилового звена практически не изменяет заряд фрагмента, в то время как его сечение увеличивается. Результат такого положения — уменьшение скорости миграции удлиненного на одно звено фрагмента по сравнению с его предшественником. На рис. 173 это хорошо видно при переходе от второго сверху пятна к третьему, т. е. от динуклеотида к тринуклеотиду. Следовательно, на третьем месте от 5'-конца в исходном олигонуклеотиде стоял цитозин (на втором, четвертом, пятом и шестом — урацилы). Легко понять, что присоединение с 3'-конца фрагмента остатка адениловой кислоты имеет качественно такой же, но слабее выраженный эффект. Как и в случае уридиловой кислоты, из-за уменьшения относительной величины происходящего изменения эффект выражен все слабее по мере укрупнения фрагментов. Это позволяет нам для рис. 173 заключить, что места 7—10 в цепочке исследуемого олигонуклеотида заняты остатками адениловой кислоты.

Таким образом, продвигаясь сверху вниз, по картине относительного сдвига пятен непрерывно удлиняющихся на одно звено фрагментов можно расшифровать всю первичную структуру олигонуклеотида. Здесь надо сделать два дополнительных замечания. Во-первых, мы ничего не узнаем таким образом о природе 5'-концевого нуклеотида, но его легко определить рассмотренными ранее методами ТСХ нуклеотидов. Например, после исчерпывающего гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда только этот нуклеотид будет представлен нуклеозиддифосфатом вида pNp . Во-вторых, метод не позволяет обнаружить модифицированные (минорные) нуклеотиды. Их приходится идентифицировать также методами ТСХ нуклеотидов или нуклеозидов после исчерпывающего ферментативного гидролиза, как описано выше, где, в частности, приводилась и методика, используемая в цитируемой работе.

Второй метод секвенирования тРНК был развит в работах Рандерата, Гупта и соавторов. В одной серии работ [Randerath et al., 1975; Randerath et al., 1979] они проводили полный ферментативный гидролиз РНКазой T1 или РНКазой A. Олигонуклеотиды фракционировали двумерной ионообменной ТСХ на пластинках PEI-целлюлозы, используя ступенчатую элюцию: в одном направлении — восемь ступенями (от 0 до 0,6 М LiCl в 0,3 М Трис-HCl, pH 7,9 + 7,5 М мочевины), во втором — пятью (от 0 до 1,8 М $HCOOLi$ в буфере с pH 3,5 и добавлением до 7,5 М мочевины), т. е. в принципе так же, как описано выше [Chen, Roe, 1978]. Пятна олигонуклеотидов локализовали под УФ-светом, вырезали и элюировали хроматографически 2 М раствором LiCl или 4 М ппридинформинатом через кусочек фосфоцеллюлозной бумаги «Whatman P-81» (которая задерживает катио-

ны) в клиновидный кончик полоски бумаги «Whatman № 1» (рис. 174). Кончик отрезали, соль отмывали 10 мл смеси этанол — изопропанол (1 : 1), сушили, олигонуклеотид элюировали водой и лиофилизировали.

Анализ последовательности оснований в каждом олигонуклеотиде проводили по следующей схеме. Воздействием щелочной фосфатазы и NaIO_4 в боратном буфере (рН 8) вели дефосфорилирование, окисление и последовательное отщепление за счет β -элиминации одного за другим нуклеотидов с 3'-конца. Отбирали аликвоты через различные промежутки времени и замораживали их, а затем концевые диальдегиды восстанавливали $[\text{}^3\text{H}]\text{-KBH}_4$, внося таким образом метку на конец каждого фрагмента. Благодаря некоторой неравномерности хода реакции для каждого времени инкубации получался набор 3—5 типов меченых фрагментов, различающихся между собой по длине на один нуклеотидный остаток. Каждый из фрагментов начинался с 5'-конца олигонуклеотида, поскольку β -элиминация идет только с 3'-конца. Чем дольше длилась инкубация, тем короче получались фрагменты. Аликвоты для разных времен инкубации наносили в ряд на старт пластинки РЕИ-целлюлозы и разделяли фрагменты одномерной ионообменной ТСХ, пользуясь опять ступенчатой элюцией нарастающими концентрациями либо LiCl (0,02—0,6 М), либо Трис-HCl , рН 8 (0,08—0,8 М), в присутствии 8,5 М мочевины. Флюорография выявляла цепочки пятен (рис. 175). Более интенсивные пятна соответствуют наиболее вероятной длине фрагмента при данном времени инкубации. Корреляция между пятнами очевидна.

Теперь задача сводилась к концевому анализу каждого пятна. Фрагменты гидролизovali РНКазой T1 прямо на пластинке (2—4 мкл раствора фермента прикапывали в центр пятна, закрывали парафильмом, прижимали его стеклом и инкубировали в течение ночи). Затем пятно вырезали, материал переносили в угол пластинки силикагеля (прижимали двумя магнитиками) и вместе со свидетелями — смесью холодных нуклеозидтриспиртов — фракционировали двумерной распределительной ТСХ. Элюцию вели в первом направлении смесью ацетонитрил—*трет*-амиловый спирт—аммиак (2 : 1 : 1), во втором — *трет*-амиловый спирт—метилэтилкетон—вода (3 : 6 : 1,2). Пятна свидетелей вырезали под УФ-светом и просчитывали в них радиоактивность. Таким образом идентифицировали один за другим все нуклеотиды с 5'-конца, начиная со второго; 5'-концевой нуклеотид определяли отдельно известными методами.

Позднее [Gupta, Randerath, 1979; Randerath et al., 1980] авторы кардинальным образом пересмотрели свою методику, перейдя в соответствии с «духом времени» на метку радиоактивным фосфором, вводимую с помощью T4-полинуклеотидкиназы. Контролируемый гидролиз тРНК вели просто нагреванием в воде. Исходная тРНК должна иметь фосфат на 5'-конце, что, как видно из дальнейшего, существенно для получения однозначных результатов. 2—10 мкг такой тРНК растворяли в 5—10 мкл дважды дистиллированной воды и прогревали 6 мин при 80°. Такая термообработка приводит к случайным разрывам сахарофосфатной цепи РНК — в подавляющем

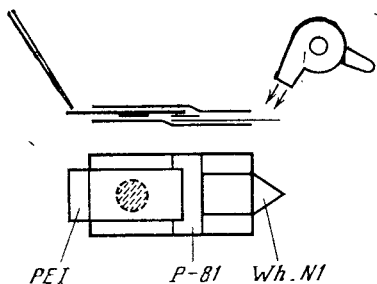
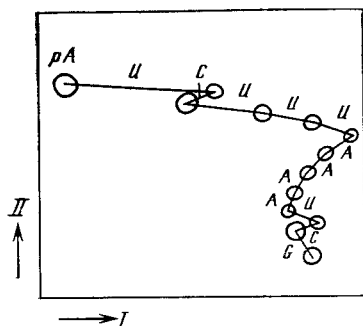


Рис. 173. Определение последовательности нуклеотидов в олигонуклеотиде «методом блуждающего пятна» (см. текст) [Silberklang et al., 1977]

Рис. 174. Элюция пятна с PEI-целлюлозы с помощью 2 M LiCl через полоску бумаги «Whatman P-81» [Randerath et al., 1979]

Рис. 175. Анализ последовательности нуклеотидов одномерной ТСХ на PEI-целлюлозе (см. текст) [Randerath et al., 1975]

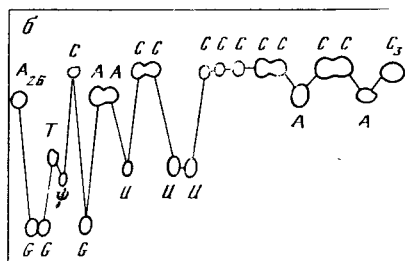
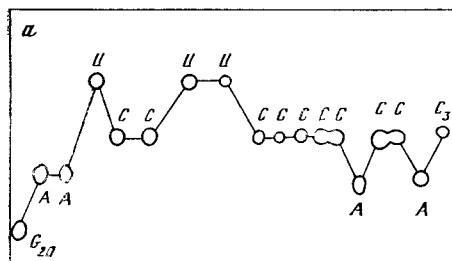
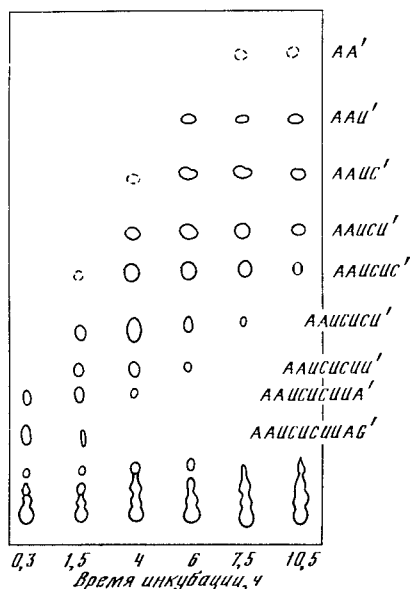


Рис. 176. Идентификация меченных ^{32}P 5'-концевых нуклеотидов смеси фрагментов, полученных прогревом тРНК в воде при 80° , после электрофореза и переваривания РНКазой T2 с целью определения нуклеотидной последовательности тРНК [Gupta, Randerath, 1979]

Одномерная ионообменная ТСХ на PEI-целлюлозе с элюцией 0,55 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (а) или 1,75 M HCOONH_4 , pH 3,5 (б)

большинстве случаев по одному разрыву на молекулу. В результате разрыва фосфат остается со стороны 3'-углерода рибозы. Таким образом, в силу случайности и равновероятности мест разрыва образуется полный набор 5'-ОН-олигонуклеотидов любой длины, начиная от укороченной на одно звено тРНК и кончая ее 3'-концевым (нуклеозидом).

Далее проводили фосфорилирование всех олигонуклеотидов по 5'-концам радиоактивным фосфором за счет $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Смесь меченых олигонуклеотидов разделяли электрофорезом в ПААГ, получая «лестницу» полос, как было описано при рассмотрении электрофореза [Остерман, 1981]. В отличие от методов секвенирования ДНК здесь каждой полоске («перекладине лестницы») соответствует фрагмент, укороченный точно на один нуклеотид по сравнению с фрагментом предыдущей полоски. Как и при секвенировании ДНК, меченые гидролизаты наносили в параллельные треки со сдвигом по времени в 4, 8 и 11 ч, а весь электрофорез проводили в течение 14 ч, с тем чтобы лучше разрешить разные по длине фрагменты участки «лестницы».

Затем одну из пластин формы снимали и на поверхность геля клали лист РЕИ-целлюлозы (20 × 40 см), заворачивали гель и пластину в целлофан, прижимали стеклом, клали груз и таким образом, за счет диффузии в течение 15—24 ч переводили картины полос на РЕИ-целлюлозу. С помощью автордиографии положение полос на ней можно было локализовать и отметить. Целый трек с «лестницей» полос вырезали, вымачивали в соответствующем буфере и весь материал прямо на пластинке переваривали РНКазой Т2, нанося раствор фермента вдоль всего трека и инкубируя под парафильмом, как описано выше для пятен.

Эта операция нужна исключительно для того, чтобы идентифицировать 5'-концевой, радиоактивно меченный нуклеотид для каждой полоски, т. е. для каждого из серии постепенно удлиняющихся фрагментов. Очевидно, что такая идентификация равнозначна определению всей нуклеотидной последовательности (с 5'-конца) для серии фрагментов, разрешенных на данном электрофоретическом треке, а в их совокупности (с учетом перекрывания) — во всей тРНК. Идентификацию вели опять-таки методом одномерной ионообменной ТСХ. Т2-РНКазные гидролизаты (все в тех же полосках) переносили контактным способом на стартовую линию еще одной пластинки РЕИ-целлюлозы. Элюцию вели подобранными оптимальными системами: 0,55 М раствором сульфата аммония и (отдельно) 1,75 М раствором НСOONH_4 (рН 3,5). Автордиография обнаруживала положение пятен меченых 5'-концевых нуклеозиддифосфатов. По этим положениям легко было провести идентификацию. 0,55 М сульфат аммония разделяет нуклеозиддифосфаты по растворимости — скорости миграции производных обычных оснований убывают в последовательности $\text{U} > \text{C} > \text{A} > \text{G}$ (рис. 176, а). Разделение элюцией НСOONH_4 при рН 3,5 идет по величине заряда и растворимости в следующей последовательности убывания скоростей миграции: $\text{C} > \text{A} \gg \text{U} > \text{G}$ (рис. 176, б). Относительные подвижности (R_F) дифосфатов минорных

оснований уточняются заранее. Метод не определяет 5'- и 3'-концевых нуклеотидов молекулы — их легко идентифицировать обычным концевым анализом. В отличие от ферментативного тепловой гидролиз тРНК почти не зависит от факта модифицированности нуклеотида, если не считать связи через метилированную рибозу. Здесь возникают трудности, которые приходится обходить, но к методу ТСХ это имеет уже косвенное отношение. Для полной расшифровки первичной структуры тРНК достаточно 1—2 мкг материала!

В аналогичной работе [Pirtle et al., 1980] электрофорез в геле вели на длине 90 см, а полосы вырезали, элюировали порознь, переваривали РНКазами T1 и T2 в растворе, а затем наносили в той же последовательности на старт пластинки РЕИ-целлюлозы для идентификации 5'-концевых нуклеозиддифосфатов.

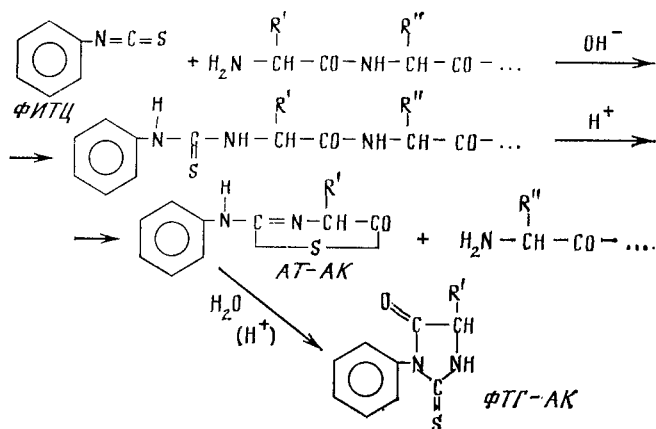
ЛИТЕРАТУРА

- Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1981.
- Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983.
- Abbasi A., Aci R., Zaidi Z. H. — J. Biochem. and Biophys. Meth., 1980, 3, p. 311—313.
- Ajro K., Borun T. W., Shulman S. D. et al. — Biochemistry, 1981, 20, p. 1454—1464.
- Arola L., Herrera E., Alemany M. — Anal. Biochem., 1977, 82, p. 236—239.
- Aromatorio D. K., Parker J., Brown W. E. — Anal. Biochem., 1980, 103, p. 350—358.
- Audubert F., Semmel M. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, 91, p. 416—426.
- Barrell B. G. — In: Procedures in nucleic acid research/Ed. G. L. Cantoni, D. R. Davies. N. Y.: Harper and Row, 1971, vol. 2, p. 751—779.
- Bij K. E., Lederer M. — J. Chromatogr., 1983, 268, p. 311—314.
- Bochner B. R., Ames B. N. — J. Biol. Chem., 1982, 257, p. 9759—9769.
- Bochner B. R., Ames B. N. — Anal. Biochem., 1983, 131, p. 510—515.
- Bochner B. R., Maron D. M., Ames B. N. — Anal. Biochem., 1981, 117, p. 81—83.
- Bonne C., Sautiere P., Duguet M., deRecondo A.-M. — J. Biol. Chem., 1982, 257, p. 2722—2725.
- Chen E. Y., Roe B. A. — Anal. Biochem., 1978, 89, p. 45—59.
- Clinton G. M., Guerina N. G., Guo H.-Y., Huang A. S. — J. Biol. Chem., 1982, 257, p. 3313—3319.
- Cracy R. W. — Meth. Enzymol., 1977, 47, p. 195—204.
- Domdey H., Gross H. J. — Anal. Biochem., 1979, 98, p. 346—352.
- Ernst V., Levin D. H., Leroux A., London I. M. — Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1980, 77, p. 1286—1290.
- Fishbein J. C., Place A. R., Ropson I. J. et al. — Anal. Biochem., 1980, 108, p. 193—201.
- Goldenberg S., Vincent A., Scherrer K. — Nucl. Acids Res., 1980, 8, p. 5057—5070.
- Gupta R. C., Randerath K. — Nucl. Acids Res., 1979, 6, p. 3443—3458.
- Hopp T. P., Woods K. R. — Biochemistry, 1979, 18, p. 5182—5196.
- Jost W., Hauck H. E. — Anal. Biochem., 1983, 135, p. 120—127.
- Kern D., Potier S., Boulanger Y., Lapointe J. — J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 518—524.
- Klasen E. C. — Anal. Biochem., 1982, 121, p. 230—233.
- Lai C. Y. — Meth. Enzymol., 1977, 47, p. 236—243.
- Macnicol P. K. — Anal. Biochem., 1978, 85, p. 71—78.
- Messripour M., Naderi S., Wise A. — Anal. Biochem., 1979, 97, p. 328—330.
- Mikeš O. — In: Laboratory handbook of chromatographic and allied methods. Chichester: Ellis Horwood, 1979, p. 512—521.
- Munns T. W., Podratz K. C., Katzman P. A. — J. Chromatogr., 1973, 78, p. 401—406.

- Niederwieser A.*—Meth. Enzymol., 1972, 25, p. 60—99.
- O'Kane D. J., Levenson R. G., Jones R. F.*—Anal. Biochem., 1978, 86, p. 214—219.
- Pirtle R., Kashdan M., Pirtle I., Durdock B.*—Nucl. Acids Res., 1980, 8, p. 805—815.
- Planck S. R., Tanabe K., Wilson S. H.*—Nucl. Acids Res., 1980, 8, p. 2771—2782.
- Platt S. G.*—Anal. Biochem., 1978, 91, p. 357—360.
- Rangel-Aldao R., Schwartz D., Rubin C. S.*—Anal. Biochem., 1978, 87, p. 367—375.
- Randerath K., Randerath E.*—In: Procedures in nucleic acid research/Ed. G. L. Cantoni, D. R. Davies. N. Y.: Harper and Row, 1971, vol. 2, p. 796—812.
- Randerath K., Randerath E., Chia L. S. Y., Nowak B. J.*—Anal. Biochem., 1974, 59, p. 263—271.
- Randerath K., Randerath E., Chia L. S. Y. et al.*—Nucl. Acids Res., 1975, 1, p. 1121—1141.
- Randerath E., Gupta R. C., Chia L. S. Y. et al.*—Europ. J. Biochem., 1979, 93, p. 79—94.
- Randerath K., Gupta R. C., Randerath E.*—Meth. Enzymol., 1980, 65, p. 638—680.
- Randerath K., Reddy M. V., Gupta R. C.*—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1981, 78, p. 6126—6129.
- Reddy M. V., Gupta R. C., Randerath K.*—Anal. Biochem., 1981, 117, p. 271—279.
- Reed R. G., MacKay C. M.*—Anal. Biochem., 1978, 84, p. 324—327.
- Rogg H., Brambilla R., Keith G., Staehelin M.*—Nucl. Acids Res., 1976, 3, p. 285—295.
- Ryoji M., Kaji A.*—Anal. Biochem., 1982, 122, p. 322—327.
- Saheki S., Saheki K., Tanaka T.*—Biochim. et biophys. acta, 1982, 704, p. 484—493.
- Sanger F., Brownlee G. G.*—Meth. Enzymol., 1967, 12, p. 361—381.
- Schmitt S., Hayes F., Reinbolt J.*—Europ. J. Biochem., 1980, 107, p. 87—94.
- Schuetz S. A., Poole G. F.*—J. Chromatogr., 1982, 239, p. 251—257.
- Silberklang M., Gillum A. M., Raj Bhandary U. L.*—Nucl. Acids Res., 1977, 4, p. 4091—4108.
- Silberklang M., Gillum A. M., Raj Bhandary U. L.*—Meth. Enzymol., 1979, 59, p. 58—109.
- Southern E. M.*—Anal. Biochem., 1974, 62, p. 317—318.
- Steinhäuser K., Wooley P., Friedrich K.*—Anal. Biochem., 1982, 120, p. 189—192.
- Stephens R. E.*—Anal. Biochem., 1978, 84, p. 116—126.
- Summers M. R., Smythers G. W., Oroszlan S.*—Anal. Biochem., 1973, 53, p. 624—628.
- Tichy H.*—Anal. Biochem., 1975, 69, p. 552—557.
- Tu C.-P. D., Wu R.*—Meth. Enzymol., 1980, 65, p. 620—638.
- Volckaert G., Fiers W.*—Anal. Biochem., 1977a, 83, p. 222—227.
- Volckaert G., Fiers W.*—Anal. Biochem., 1977b, 83, p. 228—239.
- Volckaert G., Min Jou W., Fiers W.*—Anal. Biochem., 1976, 72, p. 433—446.
- Whittaker R. G., Moss B. A.*—Anal. Biochem., 1981, 110, p. 56—60.
- Yamamoto K., Sekine T., Kanaoka Y.*—Anal. Biochem., 1977, 79, p. 83—94.
- Yeh Y.-C.*—Anal. Biochem., 1978, 86, p. 175—183.
- Zakaria M., Gonnord M.-F., Guiochon G.*—J. Chromatogr., 1983, 271, p. 127—192.

СЕКВЕНАТОРЫ БЕЛКОВ

В основе процесса секвенирования лежит реакция отщепления одного аминокислотного остатка с N-конца полипептидной цепи в результате ее реакции с фенилизотиоцианатом (реактивом Эдмана). Эта реакция проходит через три представленных ниже основных этапа: присоединение фенилизотиоцианата (ФИТЦ) к N-концу полипептида (I), отщепление модифицированной аминокислоты в виде 2-анилино-4-тиазолинового производного (АТ-АК) с освобождением укороченного на одно звено полипептида (II) и, наконец, преобразование АТ-АК в более устойчивый продукт — ФТГ-АК (III).



Этап I протекает быстро в слегка щелочной среде. Этап II можно вести в кислой безводной среде, а гидрофобное производное (АТ-АК) легко перевести в такой органический растворитель, в котором укороченный пептид выпадет в осадок. Таким образом, АТ-АК и пептид можно отделить друг от друга. Перед началом второго цикла секвенирования этот осадок должен быть снова растворен. Этап III протекает относительно медленно, так что его имеет смысл проводить отдельно, вне прибора, автоматически выполняющего последовательные циклы присоединения ФИТЦ к постепенно укорачивающимся остаткам полипептида и отщепления одной за другой АТ-производных аминокислот, которые выводятся наружу в коллектор фракций. Дополнительной обработкой водным раствором кислоты АТ-АК преобразуют в ФТГ-АК.

Таким образом, в результате секвенирования получается ряд следующих друг за другом фракций, содержащих ФТГ-производные всей последовательности аминокислот в полипептиде. Встает задача их идентификации. Эту задачу и решают (для каждой фракции отдельно) с помощью одного из хроматографических методов.

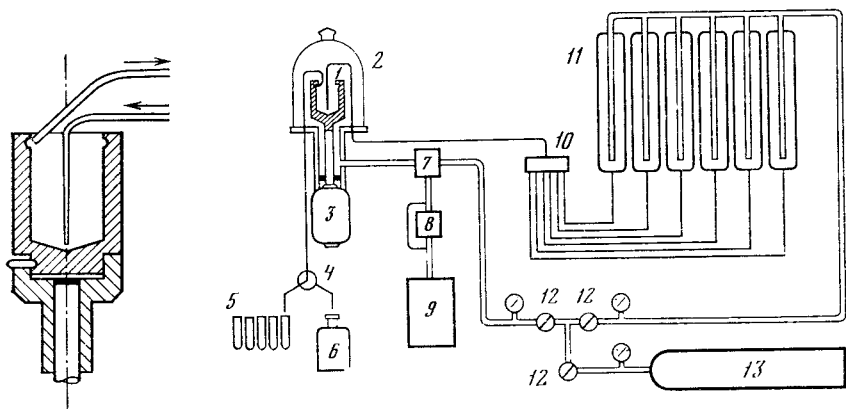


Рис. 177. Вращающаяся стеклянная чашечка секвенатора Эдмана [Edman, Begg, 1967]

Рис. 178. Схема секвенатора

1 — чашечка; 2 — вакуумный колпак; 3 — электромотор; 4, 7, 8, 10, 12 — краны; 5 — коллектор фракций; 6 — слив; 9 — вакуумный насос; 11 — сосуды с реагентами; 13 — баллон с азотом

Описанные реакции очень чувствительны к присутствию в среде кислорода, поэтому их приходится вести в атмосфере инертного газа. Кроме того, главное и особенно трудное требование состоит в совершенной полноте протекания реакции в каждом цикле. В противном случае, очевидно, от цикла к циклу будут накапливаться полипептиды, укороченные не должным образом, а производные аминокислот, которые должны были отщепиться в предыдущих циклах секвенирования, будут загрязнять продукты последующих циклов, создавая постепенно нарастающий уровень «фона». Даже при 98%-ном выходе реакции в каждом цикле через 50—60 циклов фон становится настолько высоким, что дальнейшее секвенирование оказывается невозможным.

Техническое решение задачи автоматизации повторного проведения первых двух этапов реакции было найдено Эдманом и Беггом. Устройство созданного ими автоматического секвенатора описано более 15 лет назад [Edman, Begg, 1967]. «Сердце» этого устройства — вращающаяся со скоростью 1500 об/мин стеклянная чашечка, которая и служит реакционным сосудом (рис. 177). В нее вносят исходный раствор полипептида. По центральной трубке на коническое дно чашечки один за другим, по заданной программе подаются необходимые жидкие реагенты. Благодаря вращению они тонким слоем поднимаются по стенкам чашечки. Их количество и скорость вращения можно подобрать так, что слой не достигает канавки, выполненной в верхней части чашечки. Тонкая пленка прилегающей к стенке чашечки жидкости идеально подходит для экстракции из нее вещества в другую тонкую пленку не смешивающегося с ней растворителя, которая поднимается по поверхности первой пленки. Здесь же

потом осуществляется центрифугирование осадка и его быстрое высушивание.

На стекле чашечки оседают укороченные полипептиды, когда органический растворитель вымывает из реакционной смеси отщепившиеся АТ-АК. Для этой цели растворитель подается в избытке, слой его поднимается до канавки, откуда второй трубкой раствор отводится к коллектору фракций (или сбрасывается в резервуар для отходов на тех этапах, когда проводятся промежуточные промывки или смены реагентов). Для создания инертной атмосферы чашечка вращается под стеклянным колпаком, куда подается азот. Упрощенная схема прибора показана на рис. 178. Наличие колпака позволяет провести в нужный момент необходимое подсушивание реакционной смеси в вакууме, для чего в секвенатор встроен вакуумный масляный насос (9). Реактивы из сосудов (11) подаются под давлением азота из баллона (13). Система распределительных устройств и кранов (4, 7, 8, 10, 12) с программным управлением позволяет осуществить весь цикл отщепления одной аминокислоты и подготовку к следующему циклу за 1,5 ч. Секвенаторы обычно работают круглосуточно, и секвенирование полипептида длиной 40—50 аминокислотных звеньев занимает около 3 сут.

Реакцию присоединения ФИТЦ в первоначальном варианте вели в нелетучем буфере (рН 9) на основе органического основания с торговым названием «Quadrol» и трифторуксусной кислоты. ФИТЦ подавали растворенным в гептане. Избыток ФИТЦ и буфера вымывали бензолом и раствором этилацетата в разбавленной уксусной кислоте. Модифицированный по N-концу полипептид в этих жидкостях не растворялся. Для проведения второго этапа реакции (отщепление АТ-АК) в чашечку подавали безводную *n*-гептафтормасляную кислоту. Наконец, выведение АТ-производного аминокислоты из чашечки осуществлялось растворением ее в 1-хлорбутане. Этот раствор и поступал в очередную пробирку коллектора фракций (5). Выпавший в хлорбутане осадок укороченного полипептида высушивали и снова растворяли в буфере на основе «Quadrol». Содержимое пробирок коллектора затем высушивали, добавляли по 0,2 мл 1 н. HCl и проводили реакцию преобразования АТ-АК в ФТГ-АК при температуре 80° в течение 10 мин. ФТГ-АК экстрагировали этилацетатом и далее направляли на идентификацию методом ЖХВД или тонкослойной хроматографии.

Подробное описание автоматического секвенирования белков по методу Эдмана с указанием многих экспериментальных тонкостей можно найти в обзорной работе [Niall, 1973]. За прошедшие с момента его опубликования годы сам метод и соответствующая аппаратура претерпели немало усовершенствований. С некоторыми из них заинтересованный читатель может познакомиться в ряде публикаций [Crewther, Inglis, 1975; Silver, 1977; Fairwell, Brewer, 1979; Bhowm et al., 1981a; Bhowm et al., 1981b]. Недавно было предложено заменить стеклянную чашечку металлической, а жидкости отводить из центра ее конического дна под давлением азота, для чего вращение прерывать [Inglis et al., 1981]. Было предложено также заменить

ФИТЦ препаратом, дающим окрашенные производные отщепляемых аминокислот [Wilson et al., 1979]. Здесь нет возможности останавливаться на этих и других интересных усовершенствованиях процесса секвенирования белков, поскольку это выведет нас за пределы круга вопросов, рассматриваемых в книге. Нам также придется вовсе оставить в стороне вариант секвенирования в твердой фазе (с закреплением полипептида с одного его конца на твердом носителе), а также интересное предложение о создании газо-жидкостного твердофазного секвенатора с миниатюрной неподвижной камерой, в которой полипептид задерживается на стекловолокнистом фильтре [Hewick et al., 1981].

Автоматические секвенаторы выпускаются рядом фирм. Наибольшей популярностью сейчас пользуется прибор с вращающейся чашечкой фирмы «Beckman» под торговым названием «Model 890C sequencer». В 1983 г. фирма выпустила усовершенствованную модель 890M. Конструкция этих приборов в принципе аналогична предложенной Эдманом и Беггом.

ЛИТЕРАТУРА

- Bhown A. S., Mole J. E., Bennett J. C.*— Anal. Biochem., 1981a, **110**, p. 355—359.
- Bhown A. S., Bennett J. C., Morgan P. H., Mole J. E.*— Anal. Biochem., 1981b, **112**, p. 158—162.
- Crewther W. G., Inglis A. S.*— Anal. Biochem., 1975, **68**, p. 572—585.
- Edman P., Begg G.*— Biochemistry, 1967, **1**, p. 80—91.
- Fairwell T., Brewer H. B.*— Anal. Biochem., 1979, **99**, p. 242—248.
- Hewick R. M., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Dreyer W. J.*— J. Biol. Chem., 1981, **256**, p. 7990—7997.
- Inglis A. S., Rubira M. R., Strike P. M.*— J. Biochem. and Biophys. Meth., 1981, **4**, p. 279—285.
- Niall H. D.*— Meth. Enzymol., 1973, **27**, p. 942—1010.
- Silver J.*— Meth. Enzymol., 1977, **47**, p. 247—260.
- Wilson K. J., Hunziker P., Hughes G. J.*— FEBS Lett., 1979, **108**, p. 98—102.

АМИНОКИСЛОТНЫЕ АНАЛИЗАТОРЫ

Рассмотрение принципа действия и особенностей использования аминокислотного анализатора начнем с того, что сформулируем представления об анализируемом препарате. Для наиболее интересного случая — анализа состава белка — им является смесь 20 природных аминокислот. Все компоненты этой смеси представляют одинаковый интерес, подлежат полному разделению и количественной оценке. Интервал молекулярных масс простирается от 75 (Gly) до 204 (Trp), диапазон значений pI — от 2,97 (Glu) до 10,76 (Arg). Различия в степени гидрофобности тоже выражены сильно: от гидрофильных дикарбоновых и оксикислот до весьма гидрофобных, несущих довольно протяженные алифатические и ароматические боковые группы. Заметим сразу, что такие различия должны облегчить задачу хроматографического разделения, но вряд ли позволят обойтись без ступенчатой смены элюентов. В обычных условиях хроматографии все аминокислоты достаточно устойчивы, но следует обратить внимание с этой точки зрения и на предшествующий хроматографии этап исчерпывающего гидролиза белков и пептидов (от него будут зависеть и результаты анализа). Агрегация аминокислот маловероятна, за исключением возможности окисления цистеинов до цистинов. «Неспецифическая» сорбция за счет гидрофобных взаимодействий с материалом матрицы безусловно возможна, но здесь она будет использоваться в интересах фракционирования.

В свете этих представлений имеет смысл выбрать ионообменную хроматографию (диапазон pI) на мелкопористом обменнике с достаточно хорошо выраженной гидрофобностью, т. е. на полистирольной смоле. Имея в виду исчерпывающий гидролиз белка концентрированной HCl и нежелательность введения этапа нейтрализации гидролизата, следует ориентироваться на элюцию в кислом буфере, когда аминокислоты заряжены более или менее положительно; следовательно, надо использовать сильную катионообменную смолу. Тонкость задачи фракционирования (20 компонентов!) заставляет искать обменник с малыми размерами гранул и узким диапазоном их разброса. Наконец, в интересах сокращения продолжительности анализа за счет увеличения скорости элюции (в случае аминокислот вполне допустимого) к обменнику следует предъявить требование повышенной жесткости. Всеми этими качествами обладают специально разработанные для аминокислотного анализа катионообменники типа «Aminex» фирмы «Bio-Rad» и их аналоги, выпускаемые фирмами «Durrum» и «Beckman» и перечисленные в гл. 7.

ПОРЯДОК ВЫХОДА АМИНОКИСЛОТ

Если сопоставить химические структуры боковых групп всех 20 аминокислот и хорошо известные значения pI , то, имея в виду совокупность ионных и гидрофобных взаимодействий аминокислот

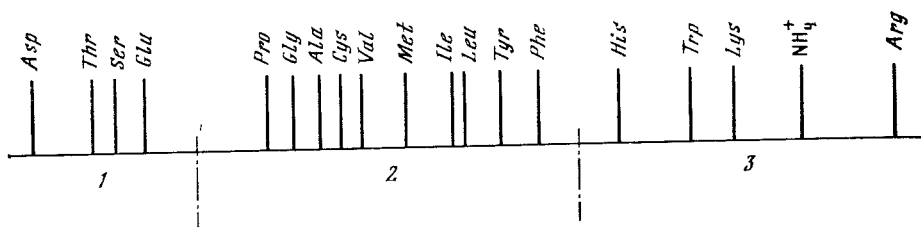


Рис. 179. Последовательность выхода аминокислот из колонки аминокислотного анализатора

с катионообменником, можно заранее высказать предположения о том, в каком порядке аминокислоты должны элюироваться с обменника.

По-видимому, в числе первых должны выходить гидрофильные и (вплоть до очень низких значений pH буфера) отрицательно заряженные дикарбоновые аминокислоты — сначала Asp (pI — 2,97), а за ней — Glu (pI — 3,22). Последними могут элюироваться основные аминокислоты Lys (pI — 9,74) и Arg (pI — 10,76). Для их элюции, вероятно, придется кислый буфер заменить на нейтральный или даже щелочной или же ввести высокую концентрацию соли. Аминокислота слабоосновного характера гистидин (pI — 7,58) будет элюироваться с катионообменника заметно легче, но здесь может сыграть свою роль гидрофобность имидазольного кольца. Значения pI для всех остальных аминокислот лежат в довольно узком интервале pH (5,06—6,53). Можно ожидать, что на порядок их элюции в большей мере повлияют различия в степени гидрофобности, чем электрический заряд. В связи с этим наименьшие шансы задержаться на колонке имеют гидрофильные оксикислоты Ser и Thr. В очень кислом буфере они могут выйти даже раньше Glu, в структуре которой фигурируют две CH_2 -группы. Сопоставление структур остальных 10 аминокислот позволяет их расположить ориентировочно в следующем порядке по возрастанию степени гидрофобности: Gly—Ala—Cys—Val—Met—Ile—Leu—Tyr—Phe—Trp. Здесь знаком Cys обозначен цистин, так как в интересах определенности результата принято цистеины в гидролизате белка принудительно окислять до цистина. Иминокислота пролин содержит кольцо пирролидина, однако ввиду отсутствия в нем сопряженных двойных связей и π-взаимодействия с ароматической матрицей степень обусловленной им гидрофобности невелика (даже меньше, чем у глицина). В рассмотрении не фигурировали аспарагин и глутамин, поскольку при кислотном гидролизе белка они дезаминируются и регистрируются совместно с аспарагиновой и глутаминовой кислотами.

На рис. 179 показана типичная схема расположения аминокислот на выходе аминокислотного анализатора («Chromaspek» фирмы «Rank Hilger») с сохранением примерного соотношения расстояний между пиками, обозначенными вертикальными отрезками. Как видно из рисунка, пики аминокислот легко можно разбить на три группы:

гидрофильные (1), гидрофобные (2) и основные (3). В последнюю группу попадает и триптофан за счет своей высокой гидрофобности. Для других марок катионообменников, на других аминокислотных анализаторах можно получить несколько иные расстояния между пиками, но общий порядок их выхода сохраняется, за исключением, пожалуй, только гистидина, который с некоторых обменников элюируется позже триптофана и даже лизина.

СИСТЕМЫ ЭЛЮЦИИ

Теперь рассмотрим варианты систем элюции, обеспечивающих такое разрешение для всего комплекта аминокислот. Ввиду явного различия хроматографических характеристик трех групп аминокислот и сходства этих характеристик внутри каждой группы можно ожидать, что наилучшим вариантом окажется трехступенчатая градиентная элюция (изократическая на каждой ступени).

Описание современных методов аминокислотного анализа нельзя начать без упоминания пионерской работы Мура и Штейна (1963 г.), с которой началось бурное развитие этих методов. В их распоряжении еще не было мелкозернистых смол; они использовали катионообменник «Amberlite IR-120». Фракционирование вели на двух колонках, заполненных этой смолой. На первой из них длиной 150 см разделяли все аминокислоты, кроме основных. Использовали двухступенчатый градиент со сменой pH буфера (3,25 и 4,25). В элюенте присутствовал цитрат натрия в концентрации 0,2 М. На вторую колонку длиной 15 см вносили дубликат исходного препарата и элюировали ее изократически, но уже 0,35 М раствором цитрата натрия при pH 5,28. Кислые и нейтральные аминокислоты быстро выходили из колонки, а основные — успешно разделялись [Moore, Stein, 1963].

В современных аминокислотных анализаторах используются мелкозернистые катионообменники. Элюция идет при повышенном давлении, на большой скорости, так что весь анализ занимает около часа. Используются колонки длиной 20—30 см. Все фракционирование осуществляется на одной колонке при повышенной температуре (50—70°). Используются, как правило, три ступени смены элюента и ступенчатые изменения температуры элюции, причем моменты изменения последней могут и не совпадать с моментами смены буфера. Десорбирующая способность элюента растет от ступени к ступени за счет увеличения pH от 3,2—3,5 (что обеспечивает отставание Glu от Asp и даже от Thr и Ser) и до 10, если ионная сила элюента остается неизменной. В других вариантах элюции от ступени к ступени увеличивается и концентрация соли (вплоть до 1—1,5 М); тогда увеличение pH ограничивается заметно более скромными цифрами, как можно видеть из приведенных ниже примеров. Использование в качестве соли цитрата натрия (или лития) удобно для кислых значений pH; кроме того, он прозрачен в УФ-области спектра. Титровать раствор цитрата натрия до нужного значения pH можно с помощью NaOH или HCl. Молярность соли надо оценивать по суммарной кон-

центрации Na^+ , который является контрионом. Иногда в элюент вносят 2—4% изопропанола — для смягчения гидрофобного взаимодействия, 1—2% триодигликоля — для защиты метионина от окисления, 0,03% неионного детергента «Brij 35» — для улучшения течения жидкости и до 0,1% фенола — в качестве бактериостатика. Проиллюстрируем сказанное о выборе ступеней элюции тремя примерами.

В аминокислотном анализаторе фирмы «Beckman» (модель 121M; колонка $0,28 \times 20$ см; смола типа «Beckman AA-10») основную роль играет увеличение концентрации соли: 1-я ступень — 0,2 н. Na-цитрат (pH 3,28); 2-я ступень — 0,35 н. Na-цитрат (pH 3,90); 3-я ступень 1,4 н. Na-цитрат (pH 4,95). В ходе элюции температуру изменяют однократно (от 50° до 65°).

В режиме, отработанном в Институте биоорганической химии АН СССР для аминокислотного анализатора «Biotronic, Model LC 7000» (колонка $0,32 \times 20$ см; смола ВТС 2712), эффективно используются оба фактора элюции: 1-я ступень — 0,12 н. Na-цитрат (pH 3,53); 2-я ступень — 0,2 н. Na-цитрат (pH 4,25); 3-я ступень — 1,1 н. Na-цитрат (pH 7,9). При этом используются две смены температур: от 50° до 55° (на 10 мин опережает первую смену элюента) и от 55° до 75° (происходит одновременно со второй сменой буфера). Препарат вносят в 0,12 М Na-цитрате (pH 2,2), обеспечивая его первоначальную сорбцию в виде узкой зоны.

Фирма «LKB» для своего аминокислотного анализатора модели 4400 (колонка $0,4 \times 27$ см, смола «Ultrapac 8») рекомендует систему элюции, опирающуюся только на изменение pH элюента: 1-я ступень — 0,2 н. Na-цитрат (pH 3,2); 2-я ступень — 0,2 н. Na-цитрат (pH 4,25); 3-я ступень — 0,2 н. Na-боратный буфер (pH 10). В ходе элюции температура изменяется дважды ($45-58-85^\circ$).

В литературе можно найти много вариантов трехступенчатых систем элюции, разработка которых стимулируется, в частности, стремлением сохранить нулевую линию регистрации при смене элюента, что улучшает надежность обсчета площади пиков на профиле элюции. Ради этого, например, недавно было предложено заменить приведенную выше стандартную схему элюции для очень популярного аминокислотного анализатора фирмы «Beckman» на следующую: 1-я ступень — 0,2 н. Na-цитрат (pH 3,25); 2-я ступень — 0,2 н. Na-цитрат (pH 4,25); 3-я ступень — 1,0 н. Na-цитрат (pH 7,40) [Barbarash, Quarles, 1982].

Следует упомянуть, что с 1982 г. фирма «Beckman» начала выпуск нового поколения усовершенствованных автоматических аминокислотных анализаторов с торговым названием «System 6300».

РЕГИСТРАЦИЯ ПИКОВ

Чаще всего регистрацию ведут путем окрашивания аминокислот нингидрином на выходе из колонки с последующей регистрацией оптической плотности окрашенных продуктов в проточном денситометре. Реакция окрашивания хорошо известна. В условиях избытка

Рис. 180. Спектры поглощения большинства аминокислот (1) и пролина (2) после окрашивания нингидрином, а также самого нингидрина (3)

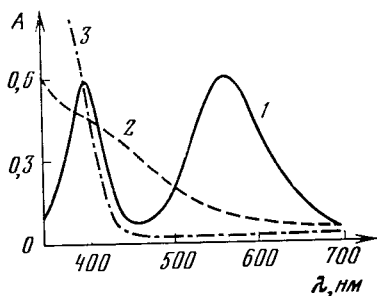
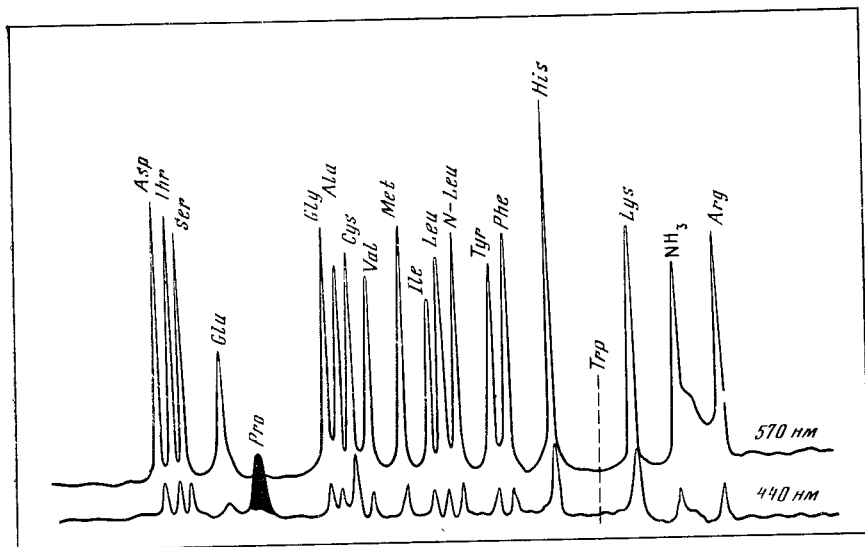


Рис. 181. Типичные профили хроматографической элюции аминокислот, окрашенных нингидрином, после разделения в аминокислотном анализаторе



нингидрин окисляет аминокислоту с отщеплением аммиака и углекислого газа. Одновременно в эквимольном количестве образуется продукт восстановления нингидрина — гидриндантин. Молекула аммиака взаимодействует с одной молекулой нингидрина и одной молекулой гидриндантина, давая пурпурного цвета продукт с максимумом поглощения при длине волны 570 нм. Реакция лучше всего идет в кислой среде (при pH 5) и заметно ускоряется при повышении температуры до 100—120°. Нингидрин с помощью отдельного насоса подается в смеситель, где смешивается с элюатом, поступающим из колонки. Смесь далее следует в реакционную спираль — тонкий стальной капилляр длиной 20—30 м, погруженный в горячую масляную баню. Так как необходимо обеспечить протекание реакции до конца, а этому может помешать ограниченность концентрации образующегося только в ходе окисления аминокислоты гидриндантина, в реакционную смесь его вносят дополнительно. Таким образом, вместо нингидрина в смеситель подают нингидриновый реактив, содержащий в своем составе еще и концентрированный буфер с pH, близким к 5. Можно, например, рекомендовать такой рецепт приготовления

ния этого реактива: 20 г кристаллического нингидрина растворяют в 700 мл диметилсульфоксида, добавляют 250 мл 4 М Li-ацетатного буфера (рН 5,5), а затем 600 мг гидриндантина, также растворенного в 50 мл диметилсульфоксида.

Реакция окрашивания идет по описанной схеме для всех аминокислот, кроме пролина, который является иминокислотой. Однако пролин тоже реагирует с нингидриновым реактивом, образуя достаточно окрашенный продукт с неявно выраженным максимумом поглощения при 440 нм. Регистрировать поглощение Pro при более коротких длинах волн рискованно, так как там резко возрастает поглощение нингидрина (рис. 180). В связи с этим современные аминокислотные анализаторы оснащаются денситометрами, регистрирующими поглощение раствора (после реакционной спирали) одновременно на двух длинах волн: 570 и 440 нм. Для этой цели можно использовать расщепление светового пучка с помощью полупрозрачного зеркала и два фотоэлемента, снабженных интерференционными фильтрами. Естественно, что и регистратор должен быть двухканальным с двумя перьями. Одно из них поневоле должно быть немного сдвинуто вдоль ленты самописца относительно другого, поэтому профиль хроматографической элюции, записанный на ленте одновременно для обеих длин волн, выглядит так, как показано на рис. 181. Соответствие малых пиков нижнего профиля (поглощение всех окрашенных нингидрином аминокислот на 440 нм не совсем равно нулю) и больших пиков верхнего (570 нм) установить очень легко. Хорошо заметный «лишний» пик на нижнем профиле соответствует элюции пролина.

При внимательном рассмотрении рис. 181 легко обнаружить, что на профиле элюции отсутствует пик триптофана (его положение обозначено пунктиром). Дело в том, что профиль был получен в результате фракционирования кислотного гидролизата белка, а триптофан при этом разрушается. К этому вопросу мы вернемся немного позже.

БЛОК-СХЕМА АМИНОКИСЛОТНОГО АНАЛИЗАТОРА

Для того чтобы иллюстрировать изложенный материал, приведем краткое описание блок-схемы одной из последних моделей аминокислотного анализатора — «Biotronik LC 7000» (рис. 182), появившегося в продаже в 1981 г.

Шесть бутылей (2) с различными элюентами (A — F) размещены в охлаждаемом отсеке прибора. Содержащиеся в них жидкости находятся постоянно под давлением азота (0,3—0,6 атм), подаваемого от подключаемого снаружи баллона (справа сверху). Давление азота в бутылках регулируется системой кранов (1, 18) и клапаном (19). Подача и смена элюентов в соответствии с заданной программой элюции происходит через распределительный кран ротационного типа (4), управляемый микропроцессором, находящимся в блоке управления (23). Блок управления имеет клавиатуру для введения программ и экран дисплея. В памяти блока может храниться 9 программ. На пути от каждой бутылки к распределительному крану стоит электро-

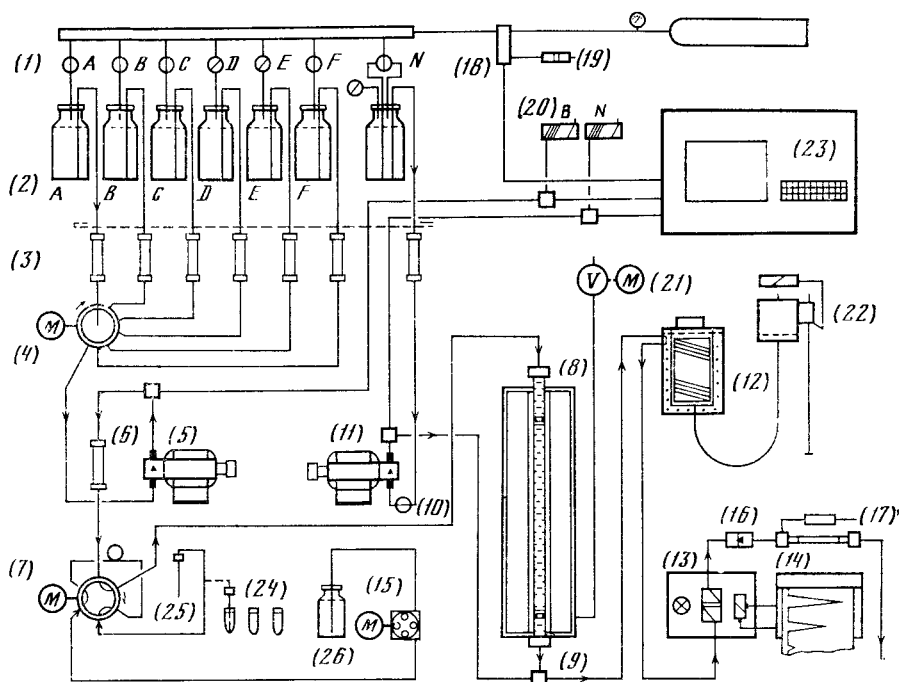


Рис. 182. Принципиальная схема аминокислотного анализатора «Biotronik LC 7000» (см. текст)

контактное контрольное устройство (3), выключающее насос в случае опорожнения бутылки, из которой подается элюент. Насос плунжерного типа (5) может создавать давление элюции до 120 атм. Микрометрический винт позволяет регулировать скорость подачи в диапазоне 10—145 мл/ч. Плунжер и клапаны насоса изготовлены из рубина. Конструкции насосов и других перечисленных ниже элементов системы для ЖХВД описаны в гл. 3.

Из насоса элюент поступает в предколонку (6), которая задерживает аммиак, если примесь его содержится в элюенте. Эта предосторожность связана с тем, что количественное определение аммиака, выходящего из колонки, используется для оценки содержания аспарагина и глутамина. За предколонкой располагается инжектор (7) с петлей на 50 мкл. Заполнение петли раствором препарата осуществляется с помощью реверсивного насоса низкого давления (15). До 100 препаратов в герметических капсулах могут быть установлены в цепь автоматической подачи препаратов (24), расположенную в охлаждаемом отсеке. По команде от микропроцессора игла (25) опускается и прокалывает пластиковую крышку очередного препарата. После впрыскивания раствора препарата в колонку (поворот инжектора осуществляет электромотор, управляемый микропроцессором)

насос (15) осуществляет промывку петли и иглы жидкостью из бутылки (26), а затем подсушивает их, просасывая воздух.

Стальная колонка высокого давления размером $0,32 \times 30$ см заполнена фирменным обменником ВТС 2712 со средним размером зерен 8 мкм. Колонка расположена внутри электронагревателя (8), снабженного вентилятором (21) для быстрого ее охлаждения. Температура колонки устанавливается и изменяется автоматически в соответствии с заданной программой в интервале $30-90^\circ$. На выходе колонки располагается смеситель (9), куда из находящейся в охлаждаемом отсеке бутылки (N) с помощью насоса (11) подается нингидриновый реактив. Скорость подачи регулируется микрометрическим винтом. Поскольку этот насос подключен к выходу колонки на стороне атмосферного давления, во избежание подтекания нингидринового реактива при выключении прибора клапан (10) перекрывает поступление реактива в насос. К трубкам подвода элюента и нингидринового реактива подключены спирали, демпфирующие пульсации давления подачи этих жидкостей (20).

Смесь элюата с нингидриновым реактивом подается в реакционную спираль (12), погруженную в масляную баню, температура которой автоматически регулируется в пределах $50-145^\circ$. Предусмотрен аварийный слив масла из бани в случае засорения капилляра спирали — питающий баню маслом резервуар (22) опускается вниз. Однолучевой денситометр (13) регистрирует поглощение света на двух длинах волн — 570 и 440 нм. Длина оптического пути в кювете 16 мм. Имеется несколько диапазонов чувствительности — от 0,1 до 2 оптических единиц на всю шкалу двухканального регистратора (14).

В приборе предусмотрен простой измеритель скорости потока жидкости (17). Он представляет собой стеклянную трубку с двумя рисками. На вход трубки подаются пузырьки воздуха, скорость перемещения которых легко подсчитать по времени прохождения известного расстояния между рисками. Манипулируя работой насосов (5) и (11), можно установить отдельно скорость элюции колонки и скорость подачи нингидринового реактива (для указанного выше состава последнего соотношение скоростей должно быть 2 : 1). На выходе всего прибора имеется запорный клапан (16). Внешний вид аминокислотного анализатора «Biotronik LC 7000» представлен на рис. 183. Прибор можно укомплектовать интегратором с микрокомпьютером (например, типа SP4100). Он производит обсчет площади пиков и (с учетом данных по калибровке прибора стандартной смесью аминокислот) печатает на ленте аминокислотный состав исследуемого препарата.

До сих пор речь шла о регистрации пиков аминокислот с помощью окраски нингидрином. Более высокую чувствительность регистрации дает флюорометрический метод. В качестве флюоресцентного красителя обычно используют ортофталевый альдегид (ОФА). Для этой цели прибор можно укомплектовать проточным флюориметром и реакционной спиралью, не нуждающейся в подогреве (тефлоновый капилляр). Подача ОФА в смеситель производится тем же самым на-

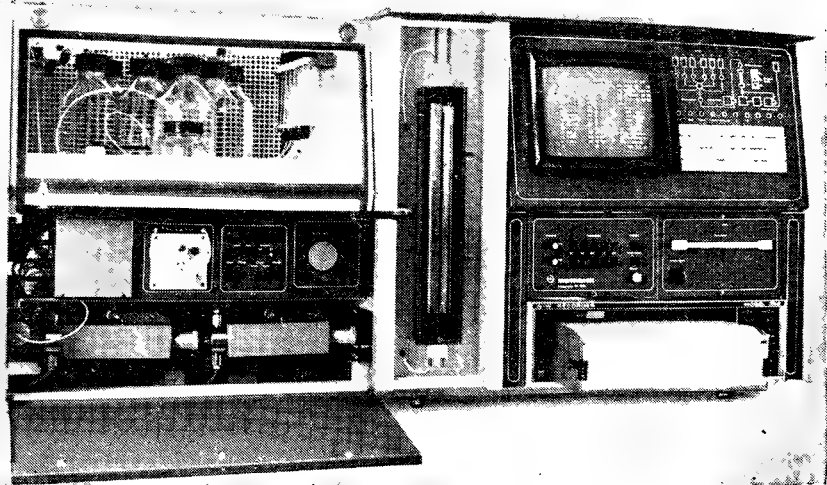


Рис. 183. Аминокислотный анализатор «Biotronik LC 7000»

сосом (11). Пролин не окрашивается ОФА, но его можно окрасить после предварительной обработки гипохлоритом натрия в щелочных условиях при температуре 50—60°. Для этой цели приходится вводить дополнительную спираль, куда перед выходом из колонки пика Про специальным насосом подается 0,005 %-ный раствор NaOCl в 0,2 M K-боратном буфере (pH 10,5) [Böhlen, Mellet, 1979]. Можно с той же целью проводить окисление пролина хлорамином T [Lee, Drescher, 1979]. Цистеин также не реагирует с ОФА, однако после обычного при аминокислотном анализе предварительного окисления до цистеинсульфо-кислоты (см. ниже) окрашивание происходит. Использование ОФА в аминокислотном анализаторе было подробно рассмотрено [Sto- pin, Nare, 1977]. Там же приведена таблица относительных выходов флюоресценции для различных аминокислот.

Радиоактивно меченные аминокислоты можно регистрировать с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика с проточной кюветой, в качестве которой используют спираль из прозрачного для УФ-излучения материала. Сцинтиллятор смешивают с элюатом на входе в спираль [Bakaу, 1975].

Аминокислотные анализаторы выпускает и ряд других фирм, на- пример «Beckmann» (модель 121 MB), «LKB» (4400), «Rank Hilger» («Chromaspek»), «Hitachi» (835).

Следует упомянуть о возможности окрашивания аминокислот белкового гидролизата перед их фракционированием на колонке. Такой подход имеет то существенное преимущество перед любым

вариантом окрашивания после колонки, что он позволяет не опасаться наличия окрашиваемых примесей в элюенте. Окрашивать смесь аминокислот можно тем же ОФА или данзилхлоридом. Окрашивание аминокислот ОФА в присутствии β -меркаптоэтанола дает не очень стабильные по флюоресценции продукты. Предпочтительнее использовать в качестве тиолсодержащего агента этантиол ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$). Однако в этом случае выход флюоресценции постепенно снижается (за 6—8 ч на 20—50%), что при автоматическом анализе большого числа препаратов является существенным недостатком. Для анализа аминокислотного состава физиологических жидкостей было предложено смешивать препарат с ОФА и этантиолом непосредственно перед анализом в специальной предколонке, заполненной стеклянными шариками. Микропроцессор с помощью инжектора подает в эту колонку последовательно краситель и препарат. Элюция на это время приостанавливается, затем в течение 3 мин идет с малой скоростью, а когда окрашенные аминокислоты переходят в рабочую колонку, скорость элюции увеличивается до нормальной [Fleury, Ashley, 1983].

Недавно Шэнг и соавторы убедительно показали преимущества использования для этой цели красителя 4-диметиламиноазобензол-4'-сульфонилхлорида (торговое название — «Dabsyl chloride», или «DABS-Cl»), поставляемого фирмой «Pierce». Однако модифицированные этим красителем аминокислоты приобретают сильно выраженную гидрофобность, поэтому их нельзя фракционировать в аминокислотных анализаторах описанного типа, а следует прибегать к методам обратнoфазовой гидрофобной ЖХВД [Chang et al., 1981].

ЧИСТОТА РЕАКТИВОВ

Чувствительность современных аминокислотных анализаторов предъявляет исключительно высокие требования к чистоте реактивов, используемых для приготовления элюентов, а также (особенно) воды. Следует использовать сухие реактивы специальной очистки или хотя бы реактивы для аналитических целей («analytical grade»). Вода должна быть только что деионизована и перегнана в кварцевом дистилляторе. Однако для анализов на субнаномолярном уровне и этого оказывается недостаточно. Хэйр рекомендует специальную очистку воды, куда входит кипячение со щелочным раствором NaOCl и обработка SnCl_2 [Hare, 1977].

Соляная кислота, которой титруют буферы, должна быть трижды перегнанной и храниться в запаянных ампулах. Посуду следует выдерживать в течение ночи при температуре 400° . Растворы элюентов необходимо готовить не более чем за сутки до использования, фильтровать через фильтры с порами не крупнее 0,45 мкм и хранить в герметически закрытых пластмассовых сосудах, желателно под азотом. Во избежание попадания в растворы аминокислот и аммиака за счет воздушной флоры и загрязнений время контакта их с воздухом (в процессе приготовления) должно быть сведено до минимума. Нельзя готовить и хранить растворы вблизи мест хранения солей

аммония или жидкостей, содержащих аммиак. Курение в помещении, где установлен аминокислотный анализатор, недопустимо. Воспроизводимость количественных анализов явно зависит от степени загрязнения атмосферы.

Нингидриновый реактив легко окисляется и темнеет при освещении и контакте с воздухом. Его следует хранить на холоду, в темноте и под азотом. Даже максимально короткие трубки подачи реактива приходится с помощью специального покрытия защищать от диффузии воздуха через их стенки. Для восстановления нингидрина в реактив иногда добавляют хлорид олова. От него в трубках постепенно накапливается нерастворимый осадок. После каждого опыта в этом случае трубки и особенно реакционную спираль следует промывать водным раствором CH_3COOH [Gurusiddaiah, Mc Fadden, 1978]. Описаны также дополнительные меры по снижению уровня загрязнений, обеспечивающие возможность проведения аминокислотного анализа на уровне 100 пмоль исходного пептидного препарата [Böhlen, Schroeder, 1982].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКА

В отличие от анализа смеси свободных аминокислот или физиологических жидкостей при определении аминокислотного состава (АК-состава) белка приходится столкнуться с немалыми трудностями, вытекающими из необходимости осуществления его полного гидролиза. общепринятым методом является исчерпывающий гидролиз 6 н. HCl при температуре 110° . Без существенных изменений до сих пор используется пропись, предложенная еще Муром и Штейном. Высушенный белок в толстостенной ампуле заливают 6 н. HCl из расчета 1 мл на 5 мг белка, замораживают в смеси сухого льда с этанолом и через короткую трубку откачивают до давления менее 0,05 мм рт.ст. Для удаления следов воздуха, растворенного в HCl , ампулу можно вынуть из сухого льда и под вакуумом начать медленно оттаивать ее содержимое. Как только в еще вязком растворе появляются пузырьки газа, ампулу снова погружают в сухой лед и откачивают повторно. Гидролиз ведут при температуре $110 \pm 1^\circ$ в печи, снабженной вентилятором, без которого перепады температуры между различными точками объема внутри печи могут достигать 15° .

Для последующей коррекции результатов разрушения некоторых аминокислот путем интерполяции к нулевому времени гидролиз следует провести для пяти аликвот одного препарата в течение 12, 18, 24, 48 и 72 ч. Для коротких пептидов этого можно не делать; достаточно вести гидролиз в течение 20 ч. Thr, Tyr и Cys разрушаются примерно на 5%, а Ser — на 10%. Однако, поскольку число аминокислот должно быть целым, такие разрушения не мешают установлению АК-состава.

Температура гидролиза должна поддерживаться очень точно. При 105° гидролиз идет не до конца (особенно прочна пептидная связь

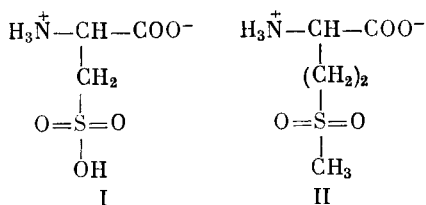
около Val и Ile); при температуре выше 110° увеличивается степень разрушения перечисленных выше лабильных аминокислот. Кроме того, при флюктуациях температуры интерполяция к нулевому времени гидролиза становится некорректной.

Впрочем, описан вариант и кратковременного гидролиза в течение 20 мин при температуре 155° [Hare, 1977]. Недавно были представлены данные о целесообразности проведения гидролиза белка 6 н. HCl в течение 4 ч при 145°. Авторы сопоставили результаты аминокислотного анализа не только чистых белков, но и различных кормов с высоким содержанием углеводов при использовании такого режима и традиционным методом (110°; 24 ч); результаты оказались примерно одинаковыми. При 145° освобождается несколько больше Val, а содержание Asp и Ser получается слегка заниженным по сравнению с гидролизом при 110°. Интерполяцией к нулевому времени гидролиза это можно учесть [Lucas, Sotelo, 1982].

Иногда в белке могут оказаться столь гидрофобные участки, что они плохо гидролизуются 6 н. HCl. В этих случаях предложено гидролиз вести смесью концентрированной HCl и трифторуксусной кислоты (2 : 1). Гидролиз при 166° в течение 25 мин дает такие же результаты, как в 6 н. HCl при 110° более чем за 24 ч. При этом заметного разрушения аминокислот, за исключением триптофана, не наблюдается [Tsugita, Scheffler, 1982].

По окончании гидролиза ампулу охлаждают до 4°, вскрывают, содержимое фильтруют через фильтр с отверстиями 0,22 мкм, HCl упаривают в роторном испарителе с однократным добавлением 1 мл воды при температуре около 40°. Сухой остаток растворяют в 1 мл воды и нейтрализуют добавлением нескольких капель пиридина (до pH ≈ 6,5), а затем нагревают до 105° и выдерживают 1 ч при этой температуре для обеспечения превращения цистеина в цистин. Затем раствор снова упаривают досуха и растворяют в 1—2 мл исходного буфера (pH 2,2).

Уже упоминалось, что не только Cys, но и Met может частично окислиться в ходе анализа. Иногда предпочитают провести их предварительное окисление еще в составе белка надмуравьиной кислотой с образованием цистеинсульфонокислоты (I) и метионинсульфона (II):



При этом разрушаются Trp и His, так что анализ АК-состава приходится проводить дважды — с окислением и без него.

Гидролиз 6 н. HCl полностью разрушает триптофан. Можно очень грубо оценить его содержание по УФ-поглощению белка, вычитая из него вклад поглощения Trp и Phe, содержание которых определяется количественно. Для точного определения содержания Trp иногда

проводят отдельный гидролиз белка в 4 н. метансульфокислоте (115—125°; 20 ч) с участием катализатора 3-(2-аминоэтил)индола (0,2%). Выход триптофана достигает 80%. Можно сохранить Trp и при щелочном гидролизе белка в 4 н. Ва(ОН)₂ при 110° в течение 24 ч. Барий после гидролиза удаляют, встряхивая гидролизат под струей СО₂. ВаСО₃ выпадает в осадок, от которого легко освободиться центрифугированием. Ряд аминокислот (Arg, Ser, Thr, Cys) в ходе щелочного гидролиза разрушается.

Для проведения количественных определений аминокислотный анализатор должен быть откалиброван. Площади пиков обычно соотносят с пиком Lys, который менее других аминокислот разрушается при гидролизе. Для оценки потерь материала в приборе, чувствительности окраски и регистрации используют калибровку с помощью стандартных растворов аминокислот точно известной концентрации (в отдельном опыте). Коэффициенты корреляции вводят в память интегратора (или учитывают при планировании пиков).

Можно поступить и по-другому: к исходному препарату белка добавить известное количество аминокислоты, заведомо не встречающейся в белках и устойчивой в условиях кислотного гидролиза. Для этой цели часто используют норлейцин (выходит между Leu и Tyr), реже — норвалин и 3-нитротирозин. Применяют и другие стандарты [Riordan, Giese, 1977].

В тех случаях, когда нужно оценить содержание лишь нескольких, рано выходящих из колонки аминокислот, имеет смысл в качестве внутреннего стандарта использовать D-глюкозаминовую кислоту («DGA»). Ее пик выходит раньше, чем Asp, имеет удобную для интегрирования форму и хорошо окрашивается нингидрином. Однако следует иметь в виду, что DGA не выдерживает условий кислотного гидролиза белка. Ее можно использовать при других видах гидролиза или для оценки содержания аминокислот в физиологических жидкостях [Stacey-Schmidt et al., 1982].

ЛИТЕРАТУРА

- Bakay B.— Anal. Biochem., 1975, 63, p. 87—98.
 Barbarash G. R., Quarles R. H.— Anal. Biochem., 1982, 119, p. 177—184.
 Böhlen P., Mellet M.— Anal. Biochem., 1979, 94, p. 313—321.
 Böhlen P., Schroeder R.— Anal. Biochem., 1982, 126, p. 144—152.
 Chang J.-Y., Martin P., Bernasconi R., Braun D. G. FEBS Lett., 1981, 132, p. 117—120.
 Cronin J. R., Hare P. E.— Anal. Biochem., 1977, 81, p. 151—156.
 Fleury M. O., Ashley D. V.— Anal. Biochem., 1983, 133, p. 330—335.
 Gurusiddaiah S., McFadden B. A.— Anal. Biochem., 1978, 88, p. 332—333.
 Hare P. E.— Meth. Enzymol., 1977, 47, p. 3—18.
 Lee K. S., Drescher D. G.— J. Biol. Chem., 1979, 254, p. 6248—6251.
 Lucas B., Sotelo A.— Anal. Biochem., 1982, 123, p. 349—356.
 Moore S., Stein W. H.— Meth. Enzymol., 1963, 6, p. 819—831.
 Riordan J. F., Giese R. W.— Meth. Enzymol., 1977, 47, p. 31—40.
 Stacey-Schmidt C., Berg P., Haymond M. W.— Anal. Biochem., 1982, 123, p. 74—79.
 Tsugita A., Scheffer J.-J.— Europ. J. Biochem., 1982, 124, p. 585—587.

НОВЫЕ СОРБЕНТЫ

ФИРМА «TOYO-SODA»

Торговые наименования всех сорбентов начинаются с обозначения «TSK-GEL», которое далее для краткости опущено.

Сорбенты для обычной хроматографии. Гель-фильтрация: для фракционирования биополимеров в интервале от 100—10 тыс. до 500 тыс. — 50 млн Дальтон — «Toyopearl HW 40...75» (6 типов). Сферические гранулы полиэтиленоксида. Обозначение размеров гранул (после цифры): S(20—40 мкм), F(30—60 мкм), C(50—100 мкм). Ионообменная хроматография: «DEAE-Toyopearl 650» и «CM-Toyopearl 650» (на основе HW-65). Размеры гранул: S(25—44 мкм) и M(44—88 мкм). Емкость по белку 25—50 мг/мл. Крупнопористые ($M_{пкл} = 5 \times 10^6$). Гидрофобная хроматография: «Butyl-Toyopearl 650» (на той же основе).

Сорбенты для ЖХВД. Гель-фильтрация: матрицы на основе крупнопористого силикагеля G2000SW — G4000SW (см. гл. 4) дополнены шестью типами матриц на основе синтетического полимера — от G1000PW до G6000PW с еще более широким диапазоном размеров пор. Ионообменники на основе G2000SW и G3000SW обозначаются теперь DEAE-2SW, CM-2SW и DEAE-3SW, CM-3SW (прежние обозначения IEX-540DEAE, IEX-530CM и IEX-545DEAE, IEX-535CM). Новые крупнопористые ионообменники на основе G5000PW: DEAE-5PW (ранее — IEX-645DEAE) и сильный катионит SP-5W. Хроматография в обращенных фазах: для пептидов и малых белков (C-18) — на основе силикагеля с размером пор 120 Å — марки ODS-120T, для крупных белков — на основе силикагеля (250 Å), модифицированного триметилхлорсиланом (C-1), — марки TMS-250 и на основе G5000PW — марки «Phenyl-5PW». Подробные сведения об этих сорбентах можно найти в ряде недавних публикаций [I. Chromat., 1983, 266, p. 341—349, 385—394; 1984, 292, p. 418—426; Anal. Biochem., 1984, 138, p. 259—261]. Сорбенты фирмы «Toyo-Soda» поставляются и рядом других фирм под названиями «LKB-Ultropac TSK», «Beckman-Sphero-gel TSK», «Merck-Fractogel TSK» (с теми же цифровыми обозначениями).

ФИРМА «PHARMACIA»

«Superose 6B» — агароза с малым разбросом размеров гранул (~30 мкм). «PerRPC» и «ProRPC» — сорбенты для ЖХВД(ХОФ) пептидов и белков на основе сферических гранул силикагеля (5 мкм) с размерами пор 100 и 300 Å типов C-18 и C-8 соответственно.

ФИРМА «MACHEREY-NAGEL»

Серия слабых анионообменников на основе силикагелей различной пористости (от 60 до 4000 Å) под общим названием «Nucleogen». Ионогенные группы: диметиламиноэтил (DMA 60 — DMA 4000) и DEAE [I. Chromat., 1984, 296, p. 339—353].

УКАЗАТЕЛЬ ПРИМЕРОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ

- Белки**
 Аллергены * 156
 Антиген HLA-B 415
 Антиген острой лейкемии из лимфо-
 бластов 415
 Аргининсукциназа мозга 430
 Аспарагинсинтетаза печени крысы 431
 Вируса рака молочной железы мыши
 139
 β -Галактозидаза печени кошки 432
 Гаптоглобин эритроцитов цыпленка
 414
 Гексокиназа сердца свиньи 421
 Гемоглобин 138
 — мутантные цепи * 212
 Гидрофобные белки 140
 — зародыша цыпленка 490
 — полиовируса * 216
 Гистоны
 * H1 и H1^o клеток яичников китайско-
 го хомячка 310
 — тифосфорилированные 419
 — эритроцитов курицы 234, 305
 — ядер тимуса * 211
 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа почки
 мыши 430
 Гонадотропин человека 151
 Гормоны (роста, ЛГ, ФСГ, гонадо-
 тропин) * 156
 Гуанилатциклаза легкого крысы 415
 Дегидратаза синтеза ненасыщенных
 жирных кислот *E. coli* 417
 Дезоксирибонуклеаза 429
 ДНК-лигаза 234, 420
 ДНК-полимераза
 * — *E. coli* 139, 304, 426, 431
 — зародыша цыпленка 421
 — фага T4 431
 ДНК-узнающие белки
 — из клеток с аденовирусом 424
 — слабо связывающиеся 426
 — узнающие определенный фрагмент
 ДНК 425
 — ядрышек гена томы 427
 Иммуноглобулин M 139
 Ингибитор аденилатциклазы мозга
 быка 415
 Интерферон
 * — асцит Эриха 304
 — лейкоцитарный * 212
 — фибробластов * 212
 — фибробластов человека 416
 Казеникиназа I
 — тимуса 430
 — печени крысы 413
 Карбоксипептидаза A мышцы
 крысы 412
 * α -Кристаллин (субъединицы) 335
 D-Лактатдегидрогеназа мембраны
E. coli 234
 * β -Лактоглобулин 302
 Малатдегидрогеназа листьев гороха
 421
 Малик-фермент почки мыши и дро-
 зофилы 430
 Маннитол-специфический фермент II
E. coli 185
 Метилаза белка мозга 432
 Миозин, легкие цепи * 158
 Негистоновые белки хроматина
 — клеток НТС 181
 — печени мыши 181, 235
 — тимуса (не HMG-типа) 140
 Нуклеаза SI *Aspergillus* 302
 Нуклеозиддифосфокиназа сердца сви-
 ньи 430
 * Обратная транскриптаза 308, 422, 429
 Орнитиндекарбоксилаза печени телен-
 ка 419
 Плазма крови * 194
 Продукт гена 32 424
 Протеиназа (сАМР) мышцы кролика
 182
 Протеинкиназа (сАМР) — регулятор-
 ная субъединица 429
 рес А из *E. coli* 432
 Репликационный белок полиовируса
 334
 Рестриктазы 423
 * — Eco RI 234, 304, 424
 Рецепторы
 — прогестерона человека 432
 — трансферрина 415
 — тиреоидных гормонов 432
 — эстрогена 166
 РНК-полимеразы
 — бактерий
 * — I — цветной капусты 308
 * — II — *Agaricus bisporus* 305
 * — II — *Asperg. nidulans* 307

* Звездочками отмечены примеры с использованием ЖХВД.

- любого источника 434
- * — печени петуха 302
- 2 — σ -фактор *E. coli* 305
- «ядро» фермента 425
- РНКаза
- — *E. coli* 303, 421
- селезенки 233
- * тРНК-синтетаза 178, 334
- аргиниловая *E. coli* 452
- Рибосомальные белки
- * — *Artemia salina* 311
- *E. coli* 212
- * — *Podosporum anserinum* 312
- Сыворотка крови
- кролика * 216
- теленка * 217
- человека * 160
- Тиолсодержащие белки печени быка 419
- Топоизомераза I зародыша пшеницы 181
- Факторы белкового синтеза 233
- ретикулоцитов кролика 423
- — элонгации 306, 307, 424
- Фактор коагуляции III 185
- Ферменты
- конверсии из почки 434
- синтеза фенильных производных у растения * 215
- цикла Кребса 451
- фосфотрансферазной системы *E. coli* 187
- Фосфатаза
- мышцы кролика 418
- дрозофилы (кислая) 233
- Цитохром-с-оксидаза 184
- дрожжей 418
- митохондрий печени 418
- Энолазы изоферменты
- — дрожжей 335
- — яда *Crotalus atrox* 315
- — яичного белка 334

Пептиды

- АКТГ * 203
- Брадикинин 299
- BrCN-пептиды
- гемоглобина * 204
- коллагена I * 206
- цитохрома c 152
- Гликопептиды 105
- различные 139, 486—489
- различные * 159, 162, 300
- Трипсиновые гидролизаты
- актиидина * 201
- BrCN-пептида т РНК-синтетазы, дрожжей 202 X
- гемоглобина 489
- интерферона * 203
- — кальмодулина * 300
- — лакказы А * 300

- миелина крысы * 207
- различных белков * 202, 203
- — рибонуклеазы 299
- рибосомального белка S2 * 202
- — Са-связывающего белка 201
- целлюлазы *Trichoderma reesei* 301
- щелочной дегидрогеназы дрожжей 489

Цистеин-содержащие пептиды 490

Факторы роста эпидермиса слюнной железы * 206

Аминокислоты (АК)

- Данзил-АК 485
- Данзил-АК * 196
- модифицированные ФИТЦ * 200
- немодифицированные 482
- немодифицированные * 194
- ОФА-меченные * 195
- фосфорилированные 485
- ФТГ-АК 484, 485
- ФТГ-АК * 197—199

Белково-нуклеиновые комплексы

- Активный хроматин печени крысы 311
- Нуклеосомы, ведущие трансляцию 440
- Поли(А)-РНП 446, 447
- Полисомы 142
- Рибосомы
- исследование белково-нуклеинового взаимодействия 428
- очистка общая 142, 187
- очистка от гликогена 244
- 60S и 40S субъединицы 179

ДНК

- Вилка редупликации 346
- вирусная из фибробластов почки обезьяны 239
- дрозофилы 240
- кодирующая синтез
- — данной мРНК 243, 439
- РНК AMV 443
- тРНК и 5S РНК 238
- комплементарная (кДНК) 243
- синтез на затравке олиго(dT)-целлюлозы 447
- новосинтезированная (SV-40) из культуры клеток 420
- Палиндромы 242
- Плазмиды 143, 144, 176, 239, 325, 440, 448
- растительного происхождения 143
- Рестрикты 173, 174, 176
- Рестрикты * 216, 325
- Рестрикты с определенной последовательностью — из суммарной ДНК 439
- Фрагменты (случайные) 240
- Фракционирование по ГЦ-составу 238, 449

ДНК—РНК гибриды

ДНК аденовируса и РНК клеток HeLa 144

ДНК субнуклеосом и пре-мРНК 144

R-петли

— на ДНК плазмиды 145

— на генах рРНК *Dictyostelium discoideum* 449

РНК

Аминоацил-тРНК 141, 172, 435, 441

Вироидная из листьев табака * 161

двунитевые вируса карликовости риса 450

двунитевые и одонитевые из картофеля 170

♦ Изоакцепторные тРНК 171, 176, 177, 323—325

— содержащие i⁶A 450

комплементарные к гену 438

мРНК 443—446

— вирус-специфические * 161

малые ядерные из HeLa 161

новосинтезированные 437—440

Очистка от ДНК 436

рибосомальные

— 18S и 28S 178, 179

— 5S и тРНК 436

фага MS2 173

Фракционирование по прочности связывания в РНП 245

ядерные из HeLa 442

Олигонуклеотиды

Секвенирование тРНК 502—509

♦ T1-РНКазного гидролизата тРНК 322

Фракционирование 449, 496

♦ Фракционирование * 322, 323

Основания, нуклеозиды и нуклеотиды

AMP и cAMP 491

♦ Дезоксирибонуклеозиды в присутствии рибонуклеозидов 319

5-метилдезокситидиловая кислота * 210

Метилированные производные гуанина в ДНК * 217

Модифицированные нуклеозиды 493

Модифицированные нуклеозиды * 208, 210

♦ Модифицированные основания * 318

Нуклеозиды, нуклеотиды, цикломонофосфаты и динуклеозидфосфаты 209, 210

♦ Нуклеотиды и короткие олигонуклеотиды 329

Нуклеотиды * 209

Нуклеотидный состав ДНК 492, 493

Нуклеотидный состав ДНК * 207, 208

Нуклеотидный состав РНК 491

♦ Основания 318, 496

♦ Основания, нуклеозиды, нуклеозидфосфаты * 320

Рибо- и дезоксирибонуклеотиды и нуклеозидтрифосфаты 493

Рибонуклеозиды, включая минорные 494, 495

♦ Цикломонофосфаты * 210, 321

Вирусы

Очистка 245

Фаг λ 145

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
✓ Глава 1	
КЛАССИФИКАЦИЯ И ЭЛЕМЕНТЫ ТЕОРИИ ХРОМАТОГРАФИИ	6
Классификация хроматографических методов	6
Классификация по принципу фракционирования	6
Классификация по способу элюции	11
Классификация по расположению неподвижной фазы.	12
Элементы теории хроматографической элюции	14
Хроматографический процесс	14
Хроматографическая зона	15
Концепция теоретических тарелок	31
Разрешение близко мигрирующих зон	34
Оптимизация условий фракционирования	36
Градиентная элюция	40
Хроматография макромолекул	44
Глава 2	
МАТЕРИАЛЫ МАТРИЦ СОРБЕНТОВ И ОБМЕННИКОВ	48
Целлюлоза	49
Гели на основе декстрана (сефадексы)	51
Агароза	53
Полиакриламидный гель (ПААГ)	54
Сефакрилы	55
Ультрогелл типа AcA	55
Полистирольные смолы	56
Полиамидные смолы	57
Кизельгур (целит, диатомовая земля)	57
Силикагель	58
Оксид алюминия	62
Пористое стекло	63
Оксидантит	63
✓ Глава 3	
ТЕХНИКА КОЛОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	65
Хроматография при низком давлении	65
Хроматографические колонки	66
Резервуары для элюента. Смесители градиента.	72
Внесение препарата в колонку	77
Перистальтические насосы	79
Детекторы	81
Коллекторы фракций	86
Вспомогательное оборудование	91
✓ Хроматография при высоком давлении	91
Колонки	93

Внесение препарата	95
Насосы	96
Задание градиента элюции	99
Детекторы	100
Автоматизация	101
Хроматография при умеренном давлении	104

Глава 4

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ	109
Общая характеристика метода	109
Основной принцип	109
Коэффициенты распределения	110
График селективности	112
Эффективность фракционирования	112
Характеристики продажных матриц	115
Матрицы для гель-фильтрации при низком давлении	115
Матрицы для гель-фильтрации при высоком давлении	124
Методические особенности гель-фильтрации при низком давлении	126
Подготовка матрицы	126
Набивка колонки	127
Проверка качества набивки. Определение V_0	129
Внесение препарата	130
Поддержание рабочего режима	132
Регенерация колонки	133
Выбор параметров хроматографического процесса	133
Выбор матрицы	133
Размеры колонки	135
Выбор элюента	135
Скорость элюции	136
Оптимизация условий эксперимента	136
Очистка и фракционирование макромолекул	137
Белки и пептиды	137
Белково-нуклеиновые комплексы	141
Нуклеиновые кислоты	143
Определение молекулярной массы белка	145
Нативные белки	146
Денатурированные белки	152
Гель-фильтрация при высоком давлении (ЖХВД)	154
Гель-фильтрация в тонком слое	162
Литература	166

Глава 5

РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	168
Вводные замечания	168
Нормальнофазовая распределительная хроматография	170
Распределительная хроматография в обращенных фазах	171
Разделение тРНК в системе ХОФ-5.	171
Разделение ДНК в системе ХОФ-5.	173
Обратнофазовая гидрофобная хроматография при низком давлении	176
Немодифицированная сефароза. Элюция снижающимся градиентом концентрации соли	176
Гидрофобизированные гели агарозы	180
Обратнофазовая гидрофобная хроматография при высоком давлении (ЖХВД)	188
Вводные замечания	188
Подготовка эксперимента	192
Фракционирование аминокислот	194
Идентификация ФТГ-производных аминокислот	196

Разделение пептидов в градиентах ацетонитрила и спиртов	201
Ион-парная хроматография пептидов	203
Разделение нуклеозидов и нуклеотидов	207
Фракционирование и очистка белков	210
Фракционирование нуклеиновых кислот	216
Нормальнофазовая ЖХВД	217
Литература	218

Глава 6

АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	221
Вводные замечания	221
Сорбенты	223
Приготовление оксиапатита	225
Сорбционные свойства оксиапатита	225
Сорбция белков	226
Сорбция нуклеиновых кислот	229
Некоторые особенности хроматографии на оксиапатите	231
Фракционирование и очистка белков	233
Фракционирование и очистка нуклеиновых кислот	236
Разделение двунитевой и одонитевой ДНК	241
Очистка гибридов ДНК—РНК	243
Очистка НК и нуклеопротеидов от гликогена	244
Очистка и концентрирование вирусов	245
Очистка белков сорбцией на «Alumina C _γ » и геле фосфата кальция в объеме	245
Нуклеопротеид-целитная хроматография	245
Хроматография на нитроцеллюлозе	246
Сорбция на пористом стекле	247
Литература	247

Глава 7

ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	249
Вводные замечания	249
Компоненты хроматографической системы	250
Ионообменники	250
Элюент	255
Хроматографируемые вещества	256
Хроматографический процесс	257
Ионные взаимодействия вещества и сорбента	257
Управление силой ионного взаимодействия	262
Неионные взаимодействия вещества и сорбента	267
Примеси ионов тяжелых металлов	268
Характеристики продажных ионообменников	268
Ионообменники на основе полистирола (смолы)	268
Ионообменники на основе полиакрилата и полиметакрилата	270
Ионообменные целлюлозы	270
Ионообменные сефадексы	272
Ионообменники на основе агарозы	275
Ионообменники для ЖХВД	276
Ионообменники для хроматографии белков при умеренных давлениях фирмы «Pharmacia»	276
Подготовка обменников к набивке в колонку	277
Преформирование и промывка	277
Перевод в нужную ионную форму	278
Опасность поглощения CO ₂	280
Дополнительные замечания	281
Выбор условий статической ионообменной хроматографии	281

Нейтрализация щелочи или кислоты без образования соли	281
Замена ионов	282
Обессоливание растворов	282
Удаление некоторых органических примесей	283
Концентрирование препаратов	284
Разделение компонентов смеси, сильно различающихся по сродству к обменнику	284
Выбор условий динамической ионообменной хроматографии	285
Выбор ионообменника	286
Выбор типа элюции	289
Выбор рН буфера для элюции	290
Выбор концентрации соли	291
Сохранение нативности препарата	292
Выбор объема элюента	292
Выбор размеров колонки	293
Выбор скорости элюции	294
Сбор и обработка фракций	295
Регенерация ионообменника	295
Аминокислотные анализаторы	295
Фракционирование пептидов	296
Химические методы гидролиза белков	296
Ферментативные методы гидролиза белков	297
Хроматография пептидов	299
Очистка и фракционирование белков	301
Концентрирование белка	302
Препаративная хроматография на ранних стадиях очистки белка	302
Фракционирование белков	309
Ионообменная ЖХВД белков	313
Система для быстрой хроматографии белков фирмы «Pharmacia»	314
Фракционирование нуклеиновых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов	316
Нуклеиновые основания	316
Нуклеозиды	319
Нуклеотиды и короткие олигонуклеотиды	319
Использование ЖХВД	320
Хроматография олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот	321
Хроматофокусирование	326
Колонки для хроматофокусирования	326
Фракционирование белков	331
Литература	336

Глава 8

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	339
Введение	339
Компоненты аффинного сорбента	342
Матрицы	342
Активация матриц	345
Спейсеры	357
Активированные спейсеры	359
Лиганды с индивидуальной специфичностью	361
Лиганды с групповой специфичностью	362
Посадка лигандов на активированные матрицы	375
Посадка лигандов на спейсеры с помощью конденсирующих агентов	382
Характер закрепления лиганда на матрице	384
Иммобилизация нуклеиновых кислот в качестве лигандов	387
Сорбенты для ковалентной хроматографии	394

Фирменные аффинные сорбенты	398
Подготовка и проведение эксперимента	399
Выбор сорбента и характера хроматографического процесса	399
Выбор концентрации лиганда	400
Загрузка сорбента	401
Выбор буфера для посадки вещества	404
Выбор элюента и метода элюции	406
Проведение эксперимента	409
Электрофоретическая элюция	411
Аффинная ЖХВД	412
Избранные примеры	412
Очистка ферментов клеточного метаболизма	412
Белки, связанные с нуклеиновыми кислотами	420
Биоспецифическая элюция белков	429
Аффинная хроматография нуклеиновых кислот	435
Аффинная элюция с ионообменника	451
Аффинный электрофорез	452
Литература	452

Глава 9

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	457
Введение	457
Носители для ТСХ и электрофореза в тонком слое	460
Ацетилцеллюлоза для электрофореза	460
Сорбенты для ТСХ	461
Техника ТСХ	466
Приготовление пластинок	466
Нанесение препаратов	467
«Проявление» пластинок (хроматографическая элюция)	471
Обнаружение пятен или полос	478
Элюция вещества с пластинки	481
Примеры использования ТСХ и ТСЭ	482
Фракционирование аминокислот и их производных	482
Фракционирование пептидов	485
Фракционирование нуклеозидов и нуклеотидов	491
Фракционирование олигонуклеотидов	496
Секвенирование тРНК	502
Литература	509
Приложение 1. СЕКВЕНАТОРЫ БЕЛКОВ	511
Приложение 2. АМИНОКИСЛОТНЫЕ АНАЛИЗАТОРЫ	515
Приложение 3. НОВЫЕ СОРБЕНТЫ	528
УКАЗАТЕЛЬ ПРИМЕРОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ	529